

LUCIANA SALINI ABRAHÃO PIRES

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS E  
ANÊMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título do Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Locatelli Dittrich

CURITIBA  
2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS E ANÊMICOS"** apresentada pela Mestranda Luciana Salini Abrahão Pires declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 24 de abril de 2009

Prof.ª Dr.ª Rosângela Locatelli Dittrich  
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Membro

Prof.ª Dr.ª Mara Regina Stipp Balarin  
Membro

Ao meu marido, Paulo de Tarso, e aos meus filhos Gabriel e Isabela, bênçãos de Deus na minha vida, pelo companheirismo, paciência, amor e alegria de todo o dia.

Ao meu pai Elias (*in memoriam*) e à minha mãe Magali, por seus ricos ensinamentos e valores de vida.

Aos familiares e amigos que se importam comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Senhor Deus, por me criar, me conduzir e me sustentar em todas as circunstâncias.

Sou muito grata aos meus pais, Magali e Elias, por toda a minha formação, por me proporcionarem tantas oportunidades, por confiarem em mim. Agradeço à minha mãe, por estar sempre pronta a ajudar, por sua amizade e constante preocupação de mãe. Ao meu pai, agradeço por seus ensinamentos, pelo seu exemplo de vida e por ter sido sempre tão orgulhoso dos seus filhos.

Agradeço à minha orientadora Professora Rosangela Locatelli Dittrich, por ter aceitado me orientar, por sua paciência e tranquilidade. Agradeço por compreender minha necessidade de conciliar o estudo, o trabalho e a família.

Meus agradecimentos ao meu marido, Paulo de Tarso, pelo seu amor, companheirismo, instrução, auxílio, por seus conselhos. Agradeço pela imensa colaboração no cuidado com nossos filhos.

Agradeço aos meus filhos, Gabriel e Isabela, pelo seu imenso carinho, por ficarem na torcida pela minha defesa, mesmo sem entender o significado disto. Agradeço ao Gabriel por querer ficar acordado comigo durante às madrugadas de trabalho. Peço que me desculpem pelos momentos que não pude estar junto de vocês e pela falta de paciência em alguns momentos.

Aos meus irmãos, Paula e Ricardo, à cunhada Clemen Silvia, à minha sogra, Dona Célia e ao meu sogro, Dr José Luiz, agradeço pelo apoio e cuidados dispensados aos meus filhos, nos momentos da minha ausência.

Ao Professor João Ricardo Dittrich, sou grata pelo apoio dado e por ter me aceitado como sua orientada no início do curso.

Ao Professor Fabiano Montiani pelas orientações dadas e por fazer parte do meu comitê de orientação.

Aos acadêmicos Luis, Gabriela, Andressa, Melina agradeço pela imensa e preciosa ajuda de vocês nas idas aos canis e quartéis para as coletas de sangue.

Agradeço a todos os militares, adestradores, proprietários dos canis, equipe do Hospital Veterinário São Bernardo por nos abrirem as portas para esta pesquisa.

Agradeço aos veterinários residentes da Clínica e Cirurgia do HV, Leandro, Jahyr, Camila, Fernanda Pena, Fernanda Ribeiro, Sávia, Suelen, Roberto, pela paciência nos momentos que eu necessitava de sangue de seus pacientes anêmicos. Sem este apoio, não seria possível realizar parte deste trabalho.

Ao veterinário residente Leandro também faço um agradecimento especial por ter me auxiliado em diversas coletas de sangue, especialmente aquelas mais complicadas.

Agradeço imensamente à zootecnista Ananda, responsável pelo canil de nutrição, por sua simpatia, alegria e disposição sempre presentes. Obrigada pela mãozinha na hora das coletas também.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Olair, Lia, Nina, Kemi, pela instrução que me deram, pela paciência com as minhas “bagunças” e pela ajuda no processamento das minhas amostras.

Agradeço à minha colega de mestrado Flávia e à dona Rosa do Laboratório de Parasitologia, que me auxiliaram nos exames coproparasitológicos.

Às minhas amigas, da equipe das “tutorianas” Yohana, Fabiana, e Adriana sou muito grata. Agradeço por suas amizades, por estarem sempre por perto e por me darem apoio nos momentos críticos.

Agradeço ao André por compartilhar comigo um pouco da sua sabedoria estatística.

## RESUMO

O ferro é fundamental ao metabolismo dos seres vivos. A determinação dos parâmetros do metabolismo do ferro, associada aos achados hematológicos, constitui uma ferramenta importante para o diagnóstico, controle e diferenciação de estados anêmicos. As anemias, de diversas origens e classificações, são encontradas freqüentemente na clínica médica de cães, representando 15,9% de todos os hemogramas realizados em cães, segundo os registros do serviço do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Existe a carência dos parâmetros normais do ferro para a população de cães no Brasil. Os objetivos do presente trabalho visaram estabelecer os valores normais para os parâmetros do ferro (ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação da transferrina (IST), transferrina e ferritina em cães saudáveis e em cães anêmicos criados na região de Curitiba – Paraná; relacionar os tipos de anemias com os índices de metabolismo do ferro; monitorar o metabolismo do ferro durante o período de tratamento de cães com diferentes tipos de anemia; avaliar a possibilidade de se inserir as provas bioquímicas do ferro na rotina laboratorial; classificar as anemias pela resposta da medula óssea e estabelecer valores do perfil do ferro para os tipos de anemias. O primeiro capítulo consiste de revisão bibliográfica sobre o metabolismo do ferro e suas aplicações, eritropoiese, classificação das anemias e análises laboratoriais para o metabolismo do ferro. O capítulo seguinte tem como objetivo a determinação dos parâmetros do ferro em cães saudáveis (120) na cidade de Curitiba e microregião, separando-os em quatro grupos, com sexo e faixa etária distintos (30 machos jovens e 30 adultos, 30 fêmeas jovens e 30 adultas). O último capítulo apresenta os valores dos parâmetros de ferro em cães anêmicos, comparando-os com os cães saudáveis e entre as diferentes classificações de anemias (pelo índice de reticulócitos, pelos índices hematimétricos e por presença ou não de inflamação) e relaciona a contagem do número de policromatófilos com o índice de reticulócitos. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR. Os resultados apresentados são os seguintes: valores médios dos parâmetros do ferro para a população de cães saudáveis, machos e fêmeas, jovens e adultos; não diferenciação dos valores do ferro entre as raças estudadas ( $P < 0,05$ ); parâmetros do ferro para os cães anêmicos, sem variação significativa dos valores para a diferenciação das anemias; valores do ferro sérico normais para as anemias microcíticas; valores normais dos parâmetros do ferro para as anemias inflamatórias; relação positiva significativa do índice de reticulócito com a contagem de policromatófilos para as anemias com  $IR > 1$ ; valores de 0 ng/mL da ferritina canina por meio de kits de imunoensaio quimioluminescente para seres humanos.

Palavras-chave: Metabolismo do ferro. Ferro sérico. Transferrina. Anemia .

## ABSTRACT

Iron is essential for the metabolism of most living beings. The determination of iron metabolism rates associated with hematological findings is an important tool to diagnosis, control and differentiation of anemic states. The anemia, from several origins and classifications, are often found in dogs medical clinic, representing 15,9% of all dog's hemograms, according to the records of the Veterinary Clinic Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of Federal University of Paraná State. There is a lack of iron parameters to the Brazilian dog population. The main objectives of this study are: to establish reference values to the iron parameters: serum iron, unsaturated iron binding-capacity, total iron binding-capacity, transferrin saturation rate (IST), transferrin and ferritin in healthy dogs and anemic dogs of Curitiba – Paraná; to correlate anemia kinds with iron metabolism rates; to monitor the iron metabolism during the treatment period in dogs with different anemia classifications; to evaluate the possibility to put the iron biochemical essays in the laboratorial procedures; to classify the anemia by their bone marrow response and to establish iron profile values to the anemia kinds. The first chapter is a bibliographic revision about iron metabolism and its application, eritropoesis, anemia classification and laboratory analysis to iron metabolism. The next chapter has as objective the iron parameters determination in 120 healthy dogs in Curitiba city and suburbs, separating them in four different groups of sex and age (30 young males and 30 adult males, 30 young females and 30 adult females). The last chapter presents iron parameters values in anemic dogs, comparing them with healthy dogs and between the different anemia classifications (by the reticulocytes count, by the hematimetrics rates and by the presence or absence of inflammation and correlates the policromatofiles number with the reticulocytes index. The analysis was done at the Veterinary Clinic Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of Federal University of Paraná State. The presented results are: the iron parameter average values to the healthy dog population, male and females, young and adults; the not differentiation of iron values between the studied races ( $P < 0,05$ ); the iron parameters to the anemic dogs, without values significant variation to anemia differentiation; serum iron value didn't decreased in microcytic anemia; inflammatory anemia presented normal values for iron parameters; reticulocyte index and policromatofiles counting were correlated significantly in regenerative anemias ( $RI > 1$ ). Values of 0 ng/mL of canine ferritin by the human chemiluminescent immunoassay.kits.

Key words: Iron parameters. Serum iron. TIBC. Anemic dogs

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO PATOGENÉTICA DAS ANEMIAS EM CÃES .....	37
QUADRO 2 – ACHADOS CLÍNICOS E FÍSICOS NA ANEMIA .....	38
QUADRO 3 – DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO E ANEMIA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	41
FIGURA 1 – PRINCIPAIS COMPARTIMENTOS DE DISTRIBUIÇÃO DO FERRO NO ORGANISMO .....	60
FIGURA 2 – MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DO FERRO SÉRICO.....	67
FIGURA 3– MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE LIGADORA DO FERRO.....	68
FIGURA 4 – CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE A CONTAGEM DE POLICROMATÓFILOS E O IR>1.....	86
FIGURA 5 – CORRELAÇÃO NÃO SIGNIFICATIVA ENTRE A CONTAGEM DE POLICROMATÓFILOS E O IR<1.....	86



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- GRAUS DE REGENERAÇÃO COM BASE NA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (RELATIVA E ABSOLUTA) .....	34
TABELA 2- MATURAÇÃO ESPERADA DOS RETICULÓCITOS CONFORME A DIMINUIÇÃO DO HEMATÓCRITO .....	35
TABELA 3- VALORES DE REFERÊNCIA DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DO CÃO .....	36
TABELA 4- VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS DO FERRO DE CÃES, POR CATEGORIA DE SEXO E IDADE .....	70
TABELA 5- VALORES MÉDIOS GERAIS DOS PARÂMETROS DO FERRO DE CÃES.....	71
TABELA 6- MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO NOS CÃES ANÊMICOS COM BASE NO ÍNDICE DE REGENERAÇÃO (<1E >1) COMPARADAS ÀS MÉDIAS DOS CÃES SADIOS.....	85
TABELA 7- COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO NOS CÃES COM ANEMIA MACROCÍTICA HIPOCRÔMICA, NORMOCÍTICA NORMOCRÔMICA E CÃES SADIOS.....	87
TABELA 8- COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS DO FERRO ENTRE OS GRUPOS DE ANEMIAS REGENERATIVAS E NÃO REGENERATIVAS .....	87
TABELA 9- MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS, ANÊMICOS SEM INFLAMAÇÃO E ANÊMICOS NA PRESENÇA DE INFLAMAÇÃO .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADF	Anemia por Deficiência de Ferro
ALA	Ácido δ-aminolevulínico
CHGM	Concentração Média de Hemoglobina
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CLLF	Capacidade Latente de Ligação do Ferro
CTLF	Capacidade Total de Ligação do Ferro
DMT-1	Proteína Transportadora de Metal Divalente-1
Epo	Eritropoetina
Hb	Hemoglobina
HFE	Proteína da Hemocromatose
HJV	Hemojuvelina
HT	Hematócrito
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMP	Integrina Mobilferrina Paraferitina
IR	Índice de Reticulócitos
IRE	Iron Responsive Elements
IREG-1	Iron Regulatory-1 ou ferroportina
IRP1	Iron Regulatory Protein 1
IRP2	Iron Regulatory Protein 2
IST	Índice de Saturação do Ferro
LEAP-1	Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1
MCVr	Volume Médio de reticulócitos
MTP1	Metal Transport Protein 1
RTf1	Receptor da Transferrina-1
RTf2	Receptor da Transferrina-2
RTf s	Receptor sérico da Transferrina
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
TNF-α	Fator-α de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFCe	Unidade Formadora de Colônia eritrocitária

UFCmg	Unidade Formadora de Colônia megacariocítica
UFCmm	Unidade Formadora de Colônia mielomonocítica
VGM	Volume Globular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	13
1.1 OBJETIVOS GERAIS	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1 METABOLISMO DO FERRO E SUAS APLICAÇÕES	15
2.1.1 Utilização do Ferro	16
2.1.2 Proteínas Ligadas ao Metabolismo do Ferro	17
2.1.2.1 Citocromo-b duodenal	18
2.1.2.2 Proteína transportadora de metal divalente-1 (DMT-1)	18
2.1.2.3 Transferrina (Tf)	18
2.1.2.4 Receptor da transferrina-1 (TfR1)	19
2.1.2.5 Receptor da transferrina-2 (TfR2)	19
2.1.2.6 Hefastina	19
2.1.2.7 Ceruplasmina	19
2.1.2.8 Ferroportina ou Ireg1 ( <i>Iron Regulator 1</i> )	20
2.1.2.9 HFE ou Proteína da Hemocromatose	20
2.1.2.10 Ferritina	20
2.1.2.11 Hemossiderina	21
2.1.2.12 Hefcidina	21
2.1.2.13 Hemojuvelina	22
2.1.3 Controle das Proteínas	22
2.1.4 Absorção do Ferro	23
2.1.4.1 Exigências orgânicas do ferro	23
2.1.4.2 Obtenção do ferro pela dieta	24
2.1.4.3 Mecanismo de absorção	24
2.1.5 Transporte e Distribuição do Ferro	26
2.1.6 Reservas do Ferro	28
2.1.7 Fisiologia da Regulação	29
2.2 ERITROPOESE	30
2.2.1 Formação da Hemoglobina	31
2.2.2 Reticulócitos	32
2.2.2.1 Porcentagem de reticulócitos	34
2.2.2.2 Contagem absoluta de reticulócitos	34
2.2.2.3 Índice de reticulócitos e porcentagem de reticulócitos corrigida	34
2.3 ANEMIA	35
2.3.1 Anemia Regenerativa	37
2.3.1.1 Anemia Hemorrágica	39
2.3.1.2 Anemia hemolítica	39
2.3.2 Anemia Não Regenerativa	40
2.3.2.1 Anemia da Resposta Inflamatória	40
2.3.3 Anemia por Deficiência de Ferro	41
2.4 ANÁLISES LABORATORIAIS PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO	44
2.4.1 Hematologia	44
2.4.2 Dosagem do Ferro Sérico	45
2.4.3 Capacidade Ligadora do Ferro (Transferrina)	45
2.4.4 Ferritina Sérica	46

2.4.5 Citologia da Medula Óssea .....	47
2.4.6 Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos (Chr).....	48
2.5 CONCLUSÕES .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS DA MICROREGIÃO DE CURITIBA</b> .....	58
3.1 INTRODUÇÃO .....	60
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	63
3.2.1 Seleção dos Animais .....	63
3.2.2 Coleta das Amostras .....	64
3.2.3. Análises Laboratoriais .....	64
3.2.3.1 Hemograma.....	65
3.2.3.2 Proteína plasmática total e fibrinogênio.....	65
3.2.3.3 Análises bioquímica.....	66
3.2.3.4 Exame coproparasitológico .....	66
3.2.3.5 Ferro sérico .....	66
3.2.3.6 Capacidade ligadora do ferro .....	67
3.2.3.7 Transferrina .....	68
3.2.3.8 Índice de Saturação da Transferrina .....	68
3.2.3.9 Ferritina .....	69
3.2.4 Análise estatística .....	69
3.3 RESULTADOS .....	69
3.4 DISCUSSÃO .....	71
3.5 CONCLUSÃO.....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>4 PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES ANÊMICOS DE CURITIBA</b> .....	77
4.1 INTRODUÇÃO .....	79
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	80
4.2.1 Seleção dos Animais e Coletas das Amostras .....	81
4.2.2 Análises Laboratoriais .....	81
4.2.2.1 Hemograma.....	81
4.2.2.2 Proteína plasmática total.....	82
4.2.2.3 Contagem de reticulócitos.....	82
4.2.2.4 Análises bioquímicas.....	82
4.2.2.5 Ferro sérico .....	83
4.2.2.6 Capacidade ligadora do ferro .....	83
4.2.2.7 Transferrina .....	84
4.2.2.8 Índice de saturação da transferrina .....	84
4.2.2.9 Ferritina .....	84
4.2.3 Análise estatística .....	85
4.3 RESULTADOS .....	85
4.4 DISCUSSÃO .....	89
4.5 CONCLUSÃO.....	93
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	98
<b>APÊNDICES</b> .....	99
<b>ANEXO</b> .....	102

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O ferro é um elemento fundamental para a manutenção da vida. Ele tem participação obrigatória e indispensável no processo hematológico. Além de ser fundamental à síntese de hemoglobina, faz parte das moléculas de mioglobina, citocromos e enzimas hemáticas, peroxidase e catalase (ANDREWS E SMITH, 2000).

O conhecimento da dinâmica do metabolismo do ferro, ou seja, absorção, circulação e armazenamento, torna-se fundamental quando são estudadas as anemias, suas causas e efeitos. O ferro é um elemento que apresenta a capacidade de variação de valência, o que ocorre constantemente dentro do organismo. Portanto ele necessita estar sempre ligado a alguma proteína para evitar que catalise a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais livres, os quais poderão lesar membranas celulares, proteínas do DNA (GUTTERIDGE et al, 1982; SMITH, 1989). Tais proteínas desempenham papel fundamental para a absorção, transporte, armazenamento e atividade do ferro, portanto necessitam ser estudadas para que seja compreendida toda a dinâmica deste elemento. Diante disto, quando estudado o metabolismo do ferro, obrigatoriamente fala-se na transferrina (proteína transportadora do ferro) e na ferritina e hemossiderina (formas de reserva do ferro).

Nem sempre a constatação da deficiência de ferro é tão evidente, podendo o ferro apresentar seus níveis sanguíneos normais, mas, na verdade, apresentar-se diminuído na sua forma de reserva, como ferritina. Por outro lado, a ferritina sérica também pode estar aumentada, devido a um processo inflamatório agudo, sem indicar exclusivamente a reserva de ferro no organismo (ANDREWS E SMITH, 2000).

Considerando-se que as anemias são freqüentes na clínica médica de cães, o estudo do metabolismo do ferro é necessário como auxílio ao diagnóstico e ao tratamento. É importante salientar que as manifestações clínicas das anemias são determinadas em parte pela sua origem específica e pela sua patogênese, no entanto, todos os sinais clínicos devem-se à capacidade reduzida de transporte de oxigênio pelo sangue (AIRD, 2000). Sendo assim, ela aparece como um dos primeiros sinais de várias doenças. Diante disto, é fundamental que se busque a sua causa específica, e não simplesmente o seu diagnóstico. A determinação dos parâmetros normais do ferro vem complementar as análises hematológicas e

bioquímicas na avaliação clínica da anemia sendo imprescindível nos casos de deficiência de ferro e para o diagnóstico preciso (LISTE et al., 1994).

Existe a carência de valores do metabolismo do ferro específicos para a população de cães no Brasil, além disto, existe a desinformação por parte do clínico veterinário quanto ao completo diagnóstico da anemia e seu tratamento ideal.

Outro fator importante a ser considerado é a falta do monitoramento adequado dos pacientes anêmicos e o acompanhamento do metabolismo do ferro e suas aplicações durante a administração de sais ferrosos nas anemias ferroprivas.

### 1.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho visou estabelecer os valores de referência para os índices do metabolismo do ferro: ferro sérico, transferrina, capacidade ligadora do ferro, índice de saturação e ferritina em cães saudáveis e em cães anêmicos criados em Curitiba – Paraná.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Correlacionar os tipos de anemias com os índices de metabolismo do ferro em cães.

Classificar as anemias pela resposta da MO e estabelecer valores do perfil do ferro para os tipos de anemias.

Avaliar a possibilidade de se inserir as provas bioquímicas do ferro na rotina laboratorial.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 METABOLISMO DO FERRO E SUAS APLICAÇÕES

O ferro é um elemento fundamental à manutenção da vida. Apresenta-se como o segundo metal mais abundante na natureza e o quarto elemento mais abundante na terra, no entanto, a maior parte dele encontra-se na forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que é insolúvel, portanto, inviável à maioria dos sistemas biológicos (ANDREWS e SMITH, 2000). No organismo, o ferro encontra-se em parte como ferro circulante, parte como ferro celular e como ferro de reserva. O ferro tem ação indispensável na eritropoese, sendo também componente das moléculas de mioglobina, citocromos e enzimas hemáticas, peroxidase e catalase (ANDREWS E SMITH, 2000).

Nas hemácias, o ferro é componente obrigatório para a formação do heme da hemoglobina, formando sítios de ligação ao oxigênio, sendo responsável pela sua distribuição aos tecidos. O ferro confere a capacidade de oxidação e redução aos citocromos na cadeia respiratória e também a diversas enzimas (ANDREWS, 2000). Além disto, vários estudos constatarem a relação do ferro com o sistema imunológico. Soyano e Gómez (1999) descreveram a função do ferro na proliferação e maturação das células do sistema imunológico, incluindo a proliferação de bactérias, parasitas e células tumorais. Sunder-Plassmann et al. (1999) discutiram uma questão importante, se a deficiência de ferro promovia uma infecção ou se ela aparecia como uma consequência desta infecção, eles sugeriram, então, que a deficiência de ferro aparece como consequência do seqüestro de ferro pelo organismo para controlar a proliferação bacteriana.

As propriedades biocatalíticas do ferro residem, principalmente, no fato deste metal poder variar de valência. Pela redução o  $\text{Fe}^{3+}$  (férrico) passa a  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso), podendo este voltar ao estado férrico através de agentes oxidantes (VILLELA, 1958). Devido à sua instabilidade, o ferro pode catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais livres, os quais poderão lesar membranas celulares, proteínas do DNA, portanto, o ferro não pode permanecer livre no organismo (GUTTERIDGE et al, 1982) devendo ligar-se ou incorporar-se a proteínas ou outros quelatos desde o processo de absorção até a sua excreção (SMITH, 1989; ANDREWS E SMITH, 2000). Devido a alta capacidade do ferro em transferir elétrons



e oxigênio, torna-se essencial para diversas funções celulares, como síntese de DNA, transporte de oxigênio e elétrons e respiração celular (PIETRANGELO, 2003).

Vários são os fatores extrínsecos e intrínsecos ao organismo que interferem no processo de homeostase do ferro. Segundo Conrad e Umbreit (2002) estes fatores dividem-se em intra-luminais, fatores da mucosa e fatores corporais. Dentre os fatores intra-luminais estão a biodisponibilidade do ferro na dieta (quantidade e forma química); alterações no pH no trato digestório e a ação de componentes da dieta que levam à quelação ou precipitação do ferro. Os fatores da mucosa envolvem alterações anatômicas das alças intestinais; quantidade e forma química do ferro disponível na mucosa; presença de certos metais e ação de determinados medicamentos que interferem na síntese de proteínas. Entre os principais fatores corporais estão as reservas orgânicas de ferro; a taxa de eritropoese e a hipóxia tecidual (CONRAD E UMBREIT, 2002).

Não há via de excreção para quantidades excessivas de ferro, portanto o controle fisiológico de sua absorção deve ser preciso (SMITH, 1997; WHITESIDE, 2001). Para que a homeostase seja mantida, é necessário que mudanças séricas e teciduais nos níveis de ferro sejam imediatamente reconhecidas de modo a ajustar a absorção intestinal e armazenamento do mineral (BARRIOS et al., 2005).

### 2.1.1 Utilização do Ferro

A distribuição do ferro para os compartimentos corpóreos está vinculada à sua função. O maior compartimento é denominado operacional, correspondendo a 69% do conteúdo corpóreo total de ferro, e constituído principalmente por compostos de função metabólica e enzimática como a hemoglobina (55%), a mioglobina (4%) e enzimas heme (citocromos, catalase e peroxidase) e não heme (10%). O outro compartimento, o de reserva, corresponde a 30% do ferro corpóreo total, representado pela ferritina (16%) e hemossiderina (14%). Estes compartimentos estão ligados a um compartimento de transporte (1%), onde o ferro está ligado à transferrina plasmática ou ligado a receptores das membranas celulares (SRAI et al., 2002; ANDREWS, 2005).

No compartimento operacional o ferro é destinado na sua maior parte para a formação do anel heme da hemoglobina. Esta molécula possui quatro átomos de

ferro considerados essenciais pois ligam-se com o oxigênio nos pulmões liberando-o nos tecidos (KRAUSE e MAHAN, 1991; ANDERSON, 2005).

A mioglobina, encontrada nas células musculares, contém um grupo heme idêntico ao da hemoglobina. Serve para armazenar e aumentar a taxa de difusão de oxigênio pela célula durante o exercício físico (ANDERSON, 2005).

O ferro enzimático é encontrado na forma de proteínas heme, contendo um complexo ferroporfirina (como os citocromos que atuam no transporte de elétrons na cadeia respiratória), ferroflavoproteínas e enzimas que requerem ferro como cofator (ANDERSON, 2005; UMBELINO e ROSSI, 2006). O ferro atua também em processos metabólicos como na síntese de purinas (compostos estruturais do DNA e RNA), carnitina, colágeno e neurotransmissores (dopamina, serotonina e norepinefrina) (ANDERSON, 2005; UMBELINO e ROSSI, 2006).

A ferritina e a hemossiderina são os compostos férricos de reserva e estão envolvidos na manutenção da homeostase do ferro no organismo (KRAUSE e MAHAN, 1991).

### 2.1.2 Proteínas Ligadas ao Metabolismo do Ferro

O controle do metabolismo do ferro nos mamíferos requer uma rede molecular complexa e extremamente regulada. Algumas proteínas envolvidas, como a transferrina, ferritina e receptores da transferrina-1 (RTf1), possuem a sua função e modo de ação já estabelecidos. No entanto, nos últimos anos, foram descritas novas moléculas proteicas relacionadas à homeostase do ferro. Entre elas estão os transportadores de ferro ferroso como a proteína transportadora de metal divalente-1 (DMT-1) e a ferroportina, também conhecida como Ireg1 (*Iron regulatory-1*); enzimas com função ferroredutase como o citocromo-b duodenal; enzimas com atividade ferroxidase como a hefastina e a ceruplasmina e as chamadas proteínas reguladoras como o receptor da transferrina-2 (RTf2), a proteína da hemocromatose ou HFE, a hepcidina e a hemojuvelina (HJV) (BEAUMONT, 2004; BARRIOS et al., 2005).

Tais proteínas desempenham papel fundamental para a absorção, transporte, armazenamento e atividade do ferro, portanto serão descritas suas particularidades e funções para que seja compreendida toda a dinâmica deste elemento.

#### 2.1.2.1 Citocromo-b duodenal

Proteína heme ferroredutase, responsável pela redução do ferro férrico para ferroso. Está presente nas vilosidades intestinais ligada à membrana celular apical dos enterócitos, tornando possível a ligação do ferro através da proteína transportadora de íon metal divalente-1 ou DMT-1 (MC KIE et al.,2001)

#### 2.1.2.2 Proteína transportadora de metal divalente-1 (DMT-1)

Primeira proteína a transportar o ferro no organismo, sendo responsável por transferir o ferro da luz intestinal para os enterócitos através da membrana celular apical. Atua também mobilizando o ferro liberado nas vesículas endossomais, durante o ciclo da transferrina, para o citosol dos precursores eritróides (FLEMING et al., 1998). Transporta também outros metais pesados como manganês, cobre, cobalto, zinco, cádmio e chumbo. Sua presença é regulada pelas reservas de ferro do organismo e pelo nível de ferro da dieta (BARRIOS et al.,2005).

#### 2.1.2.3 Transferrina (Tf)

A Transferrina é uma glicoproteína produzida no fígado, responsável pelo transporte do ferro no plasma e no meio extracelular (ANDREWS, 2000). Existe no plasma sob três formas: desprovida de ferro (apotransferrina), ligada a uma molécula de ferro (transferrina monoférrica) e ligada a duas moléculas de ferro (transferrina diférrica) (LIEU et al., 2001). Suas principais funções são: a solubilização do  $Fe^{+3}$ ; a ligação do ferro evitando a formação de radicais livres e o transporte do íon para as células, através de uma interação com receptores de membrana, os receptores de transferrina (LIEU et al., 2001; TESTA, 2002, MONTEIRO et al., 2006). Cerca de 80% do ferro ligado à transferrina é liberado na medula óssea para a produção de hemoglobina e para a manutenção dos precursores eritróides. O ferro remanescente é transportado para músculos e outros tecidos, para a produção de proteínas e/ou enzimas que contém ferro ou é armazenado principalmente no fígado como ferritina (CONRAD et al., 1999).

#### 2.1.2.4 Receptor da transferrina-1 (RTf1)

Estrutura protéica que atua como receptor da transferrina nas membranas celulares. Liga-se à HFE e à transferrina sérica formando complexos (RTf1-Tf-Fe<sup>3+</sup>) que são internalizado nos enterócitos das criptas, formando os endossomos. Também está envolvido na importação de ferro pelos precursores eritróides e macrófagos.

#### 2.1.2.5 Receptor da transferrina-2 (RTf2)

Receptor com 66% de semelhança estrutural ao RTf1, possui algumas propriedades que a diferem da sua homóloga (WEST et al., 2000; BARRIOS et al., 2005). Entre as principais diferenças estão: RTf2 não se liga à proteína HFE; seu padrão de expressão é elevado no fígado e não possui elementos responsivos ao ferro (IRE) em sua região 3' UTR do RNAm. Acredita-se também que pode mediar a incorporação celular de ferro, diretamente proporcional à saturação da transferrina plasmática (BARRIOS et al., 2005). Sua função exata ainda é desconhecida, no entanto já se torna evidente sua importância na homeostase do ferro, uma vez que mutações no seu gene causam a hemocromatose hereditária (CAMASCHELLA et al., 2000; ROETTO et al., 2002)

#### 2.1.2.6 Hefastina

Proteína rica em cobre, com significativa semelhança estrutural e funcional à ceruloplasmina plasmática (VULPE et al., 1999). É expressa na membrana basolateral e em vesículas citoplasmáticas dos enterócitos. Atua como ferroxidase permitindo a passagem do ferro do citoplasma do enterócito para a circulação (VULPE et al., 1999; ROY e ANDREWS, 2001),

#### 2.1.2.7 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina atua de maneira semelhante à hefastina, como ferroxidase sérica, na membrana celular dos macrófagos (THEURL et al., 2002).

#### 2.1.2.8 Ferroportina ou Ireg1 (*Iron Regulator 1*)

Glicoproteína localizada na membrana basolateral dos enterócitos, no duodeno. Trata-se de uma proteína exportadora de  $\text{Fe}^{+2}$  para a corrente circulatória através da membrana basolateral. Também chamada de IREG-1 ou MTP1 (*metal transport protein 1*) (ABBOUD e HAILE, 2000; DONOVAN et al., 2000; MCKIE et al., 2000; HENZTE et al., 2004). É expressa nos tecidos que possuem demanda pelo ferro, incluindo sistema mononuclear-fagocitário, fígado, baço, placenta e músculos. É essencial para a absorção e liberação das reservas corporais de ferro (fígado e células mononucleares), e também para a reciclagem do ferro heme pelos macrófagos (THEURL et al., 2002; BARRIOS et al., 2005).

#### 2.1.2.9 HFE ou Proteína da Hemocromatose

Encontrada principalmente na membrana basolateral dos enterócitos das criptas intestinais, hepatócitos, glândulas endócrinas, coração e macrófagos (PIETRANGELO, 2004; BARRIOS et al., 2005). Interfere na absorção do ferro, pois liga-se aos receptores de transferrina-1 (RTf1) na membrana celular competindo com a transferrina e impedindo a sua ligação aos mesmos (FEDER et al., 1998). É no gene que expressa a HFE que ocorre a mutação C282Y, a mais comum das mutações que causa a hemocromatose hereditária no ser humano (FEDER et al., 1996; ROY e ANDREWS, 2001; BARRIOS et al. 2005; CUBAS, 2008)

#### 2.1.2.10 Ferritina

A ferritina, proteína intracelular de reserva do ferro, consiste de uma cápsula de apoferritina, podendo acomodar até 4.500 átomos de ferro na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) liberando-os para o citosol e meio extracelular como ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (HARRISON e AROSIO, 1996). Foi demonstrado que a molécula de ferritina, quando completamente saturada, pode conter mais de 20% de seu peso em ferro (FAIRBANKS et al., 1971). Sua molécula é formada por 24 subunidades de dois tipos, o H (*heavy*) e o L (*light*) (THEIL, 1987). A proporção entre as subunidades H e L pode sofrer variações conforme o tipo de tecido e dependendo das condições fisiológicas da célula. A cadeia H é encontrada em células com elevada necessidade

para a síntese de heme, como as do músculo cardíaco e precursores eritróides, enquanto a cadeia L predomina em tecidos relacionados com o estoque de ferro, como o hepático e esplênico (TORTI e TORTI, 2002). A subunidade H apresenta propriedades enzimáticas com atividade ferroxidase convertendo  $Fe^{+2}$  em  $Fe^{+3}$  quando esse é internalizado para o seu centro mineral. Outra característica dessa subunidade é de ligar e liberar moléculas de ferro com maior facilidade do que a subunidade L (THEIL, 1987). Por sua vez, a cadeia L está associada à nucleação, mineralização e longo tempo de armazenamento das moléculas de ferro (TORTI e TORTI, 2002; CARRONDÓ, 2003; YOU e WANG, 2005; MONTEIRO et al., 2006)

A ferritina também é uma das proteínas de fase aguda e, portanto, pode estar aumentada em diversas reações inflamatórias, quando a interleucina-1 é produzida, não estando relacionada apenas a reservas de ferro no organismo (ANDREWS E SMITH, 2000).

A capacidade da ferritina em seqüestrar o ferro lhe confere a função de reserva, além de preservar o ferro em uma forma não tóxica (HARRISON e AROSIO, 1996; TORTI e TORTI, 2002).

#### 2.1.2.11 Hemossiderina

A hemossiderina é uma das formas de reserva do ferro, é insolúvel em água, permanecendo nos tecidos processados para exames histológicos (ANDREWS & SMITH, 2000). O ferro remanescente para a formação da ferritina é depositado como hemossiderina, um componente tecidual contendo grânulos de ferro coloidal (BACILA, 2003)

#### 2.1.2.12 Hepcidina

A hepcidina é um peptídeo antimicrobiano produzida no fígado, originalmente chamada de LEAP-1 (*Liver-expressed Antimicrobial Peptide 1*). Detentora de 25 aminoácidos e rica em cisteína com pontes dissulfeto (KRAUSE et al., 2000). Park et al. (2001) relataram a presença deste mesmo peptídeo de ação antimicrobiana na urina, chamando-o de *hepcidin* (***hepatic bactericidal protein***). Importante regulador do metabolismo do ferro é tido como principal mediador na anemia por inflamação (GANZ, 2003). Possui importante papel como regulador negativo na absorção de

ferro no intestino e na liberação do ferro pelos macrófagos, em resposta ao aumento das reservas corporais do metal ou em razão de reação inflamatória (LAFTAH et al., 2004; RIVERA et al., 2005). Ela regula diretamente a expressão da ferroportina nas membranas celulares (NICOLAS et al., 2002)

Em baixas concentrações de hepcidina, as células intestinais são estimuladas à absorção do ferro e há um aumento na expressão da ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos, estimulando o transporte do ferro na corrente circulatória e aumentando a liberação deste metal a partir dos macrófagos do sistema retículo-endotelial. Por outro lado, quando aumenta a secreção de hepcidina, diminui a absorção e retenção do ferro nos enterócitos e macrófagos do sistema retículoendotelial (GANZ, 2005; PAPANIKOLAOU e PANTOPOULOS, 2005)

Sua síntese é estimulada pelo excesso de ferro no organismo e pelas respostas inflamatórias e inibida em casos de anemia e hipóxia (GANZ, 2005).

#### 2.1.2.13 Hemojuvelina

É a proteína mais recente vinculada ao metabolismo do ferro, descoberta em 2004 (RODRIGUEZ MARTÍNEZ et al., 2004; DARAIO et al., 2005). Sua função ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que possa ser um dos elementos reguladores da expressão da hepcidina (BARRIOS et al., 2005) Está relacionada à hemocromatose juvenil, doença onde os níveis de hepcidina estão diminuídos (NIEDERKOFER et al., 2005; CUBAS, 2008).

#### 2.1.3 Controle das Proteínas

O controle genético da síntese das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro é feito pelas proteínas reguladoras de ferro 1 e 2, IRP1 e IRP2 (*Iron Regulatory Protein*), que são proteínas citosólicas que se ligam a elementos ferro-responsivo (IRE – *Iron Responsive Elements*) dos RNAm das respectivas proteínas (PHILLIPS et al., 1996; SMITH, 1997).

Os IRE são seqüências de nucleotídeos conservadas, constituídas por 28 bases e que interagem com as IRP (PÉREZ. et al., 2005). Localizam-se nos

extremos 5' ou 3' de regiões UTR (*untranslated region*– regiões não traduzidas) dos RNAm das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro (THEIL, 1994; BARRIOS et al., 2005; CUBAS, 2008).

Ao interagir com os IRE na extremidade 5' UTR, as IRP podem bloquear a tradução protéica, pois é nessa extremidade que ocorre a união do RNAm ao ribossomo e se inicia a tradução; ou podem estabilizar o RNAm, quando a ligação IRP-IRE ocorrer na extremidade 3' UTR (final da tradução), evitando a degradação do RNAm pela ação de endorribonucleases (EISENSTEIN e BLEMINES, 1998; PÉREZ, et al., 2005; CUBAS, 2008).

#### 2.1.4 Absorção do Ferro

O processo de absorção do ferro é fisiologicamente regulado servindo como mecanismo primário para o controle do seu balanço. A absorção é variável conforme os níveis de estoques de ferro teciduais, a taxa de eritropoese e a hipóxia tecidual (CONRAD e UMBREIT, 2002).

##### 2.1.4.1 Exigências orgânicas do ferro

A quantidade de ferro presente no organismo é regulada principalmente pela absorção duodenal do ferro ingerido conforme as necessidades orgânicas (CONRAD; UMBREIT, 2000). Desta forma, existe um equilíbrio entre as quantidades absorvidas e as quantidades excretadas. Suas exigências orgânicas nos animais domésticos variam em função da idade, da taxa de crescimento e da disponibilidade das fontes dietéticas do elemento. De acordo com Chausow e Czarnecki-Maulden (1987), os cães necessitam de no mínimo 80mg de ferro disponível/Kg de alimento (17,0mg ferro/1000 kcal ME). Em um homem adulto (70Kg) o peso total do ferro corpóreo corresponde a aproximadamente 4g (CONRAD; UMBREIT, 2002), correspondendo a uma concentração de 60 ppm (BOTHWELL et al., 1979; CRICHTON, 1991).



#### 2.1.4.2 Obtenção do ferro pela dieta

O ferro é introduzido pelos alimentos, normalmente em quantidade suficiente para as necessidades do organismo. Os alimentos podem ser classificados conforme o nível de ferro que apresentam, da seguinte forma: em alto (>50ppm) como as carnes de fígado e coração, a levedura de cevada, germe de trigo, gemas de ovos, ostras e certas vagens e frutas secas; intermediário (10-50 mg de ferro), como as carnes de músculos, peixes e aves, a maioria dos vegetais verdes e a maioria dos cereais; e baixo (< 10ppm), como o leite e derivados e a maioria dos vegetais não verdes (FINCH, 1980).

#### 2.1.4.3 Mecanismo de Absorção

A absorção do ferro ocorre quase que exclusivamente no duodeno, seguindo uma seqüência de passos que incluem a redução do ferro alimentar de seu estado férrico a ferroso, a internalização apical do mineral, o armazenamento intracelular ou o transporte intercelular e a liberação basolateral (BARRIOS et al., 2005). É indispensável a atuação das proteínas envolvidas em todas as etapas do metabolismo do ferro.

A absorção ocorre na borda em escova das células epiteliais das vilosidades intestinais (enterócitos), no intestino delgado, mais especificamente no duodeno e jejuno proximal. A sua absorção é regulada pelas necessidades do organismo, de forma a existir um equilíbrio entre as quantidades absorvidas e as excretadas (SRAI et al., 2002). Os enterócitos fazem absorção e transporte de ferro intestinal, modulando sua absorção através das membranas apical e basolateral. A membrana apical é responsável por transportar o ferro contido no grupamento heme e os íons inorgânicos para o interior dos enterócitos e a membrana basolateral transfere este ferro absorvido para a circulação sangüínea (ROY e ENNS, 2000; SRAI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2006).

A absorção do ferro é regulada nas interfaces dos enterócitos e depende da quantidade de ferro na dieta. Quando ocorre o acúmulo de ferro intracelular, a membrana apical, especializada no transporte de ferro-heme e ferroso para o enterócito, impede a aquisição excessiva do íon (LIEU, et al., 2001). A absorção também é dependente dos níveis de estoque no organismo e diretamente

influenciada pela concentração do índice de saturação da transferrina (IST). Este mecanismo influencia a quantidade de ferro a ser absorvida nos estados de carência, pois propicia o acúmulo do ferro não hêmico proveniente da dieta. Especula-se que exista um componente solúvel responsável pela transmissão de mensagens entre o intestino, o músculo e o fígado (FEELDERS et al., 1999; LIEU, et al., 2001)

O ferro proveniente da dieta pode estar na forma heme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou iônica ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ), possuindo diferentes mecanismos de absorção. A maior parte do ferro inorgânico (não heme) adquirido da dieta encontra-se sob a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (FINCH e COOK, 1984) Quanto menor o número de íons da sua molécula, mais fácil será a sua absorção, desta forma, os sais ferrosos bivalentes são melhor aproveitados que os sais férricos trivalentes, uma vez que são solúveis em pH mais neutro (7,0), enquanto o íon férrico já se torna insolúvel em pH maior que 3,0.

São conhecidas vias distintas para a absorção e transporte dos íons férrico e ferroso do ferro inorgânico. A via IMP (integrina / mobilferrina / paraferritina) para o  $\text{Fe}^{+3}$  e a via do DMT-1 (*divalent metal transporter 1*) ou Nramp-2 (*natural resistance-associated macrophage protein*) para o  $\text{Fe}^{+2}$ . Neste é formado um canal transmembrana para a passagem de metais divalentes, como ferro, cobalto, zinco, manganês, cobre, níquel e cádmio, para o interior das células (CONRAD et al., 1999; LIEU et al., 2001; SRAI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2006).

Segundo Conrad e Umbreit, 1993, em meio ao pH ácido estomacal, o ferro combina-se à molécula de mucina, a qual promoverá a liberação do ferro inorgânico para as células intestinais em uma forma viável para a sua absorção. No duodeno, e em meio ao pH mais alcalino, o ferro é transferido da mucina para as membranas das células de absorção (enterócitos), ligando-se à mobilferrina. Esta serve como proteína transportadora de ferro dentro das células absorptivas. O íon férrico entra na mucosa intestinal via uma b3-integrina ligando-se à proteína mobilferrina. Forma-se, então, a paraferritina, um complexo protéico composto pela b3-integrina, mobilferrina e flavina monoxigenase, a qual atua como uma ferriredutase, reduzindo o ferro ao estado ferroso, forma na qual é disponibilizado para a síntese de proteínas contendo ferro (CONRAD et al., 1999; LIEU et al., 2001).

O íon férrico também pode ser absorvido na membrana apical do enterócito pela via DMT-1, onde será primeiramente reduzido a  $\text{Fe}^{+2}$  pela proteína

ferroredutase citocromo-b duodenal (Dcytb) e, em seguida, transportado através da membrana pela proteína DMT-1 (ANDREWS, 2000; HENTZE et al., 2004).

Ao ser ingerido, o ferro heme, das hemeproteínas, é liberado da globina pela digestão proteolítica de enzimas pancreáticas e entra nas células da mucosa intestinal como uma metaloporfirina intacta. Essa entrada é facilitada por receptores de grupamento heme e um sistema vesicular de transporte. Dentro do enterócito, o  $\text{Fe}^{+2}$  é liberado da estrutura tetrapirrólica, protoporfirina, pela heme-oxigenase microssomal e passa à circulação do mesmo modo que o ferro inorgânico (CONRAD et al., 1999; EMERIT et al., 2001; LIEU et al., 2001; TESTA, 2002).

### 2.1.5 Transporte e Distribuição do Ferro

No enterócito, o ferro pode seguir diferentes destinos determinados pela demanda orgânica: a) armazenado como ferritina, podendo ser excretado posteriormente com a descamação dos enterócitos senescentes; b) utilizado nas funções celulares; c) transferido através da membrana basolateral para a corrente circulatória por intermédio da proteína ferroportina (Ireg1). Quando a produção de eritrócitos encontra-se aumentada ou em estados de deficiência de ferro, pouca ferritina é produzida deixando o ferro disponível para o transporte através da membrana basolateral (SRAI et al., 2002; ANDREWS, 2005; MONTEIRO et al., 2006). Para que ocorra a passagem do ferro através da membrana basolateral do enterócito o ferro é oxidado pela enzima ferroxidase, a hefastina, permitindo sua rápida ligação à transferrina plasmática (LIEU et al., 2001; GOSWAMI et al., 2002).

O ferro liga-se à transferrina para ser transportado no plasma e no líquido extracelular. A porção de ferro ligada à transferrina representa uma pequena fração do ferro total disponível no organismo, mas segundo Andrews (2000), é considerada a reserva mais importante devido à sua elevada taxa de utilização. A transferrina possui dois sítios de ligação para o ferro, podendo ser chamada de monoférrica, quando apenas um dos sítios está ligada, ou diférrica, também chamada de saturada, quando os dois sítios estiverem preenchidos (FAIRBANKS, 1994). O ferro liberado após a degradação da hemoglobina, no sistema monocítico fagocitário também liga-se à transferrina (FAIRBANKS, 1994).

Para que ocorra a transferência do ferro da transferrina para as células, é necessário que ocorra um processo de internalização desta molécula. A transferrina

precisa ligar-se a receptores específicos (TfR), localizados em fossas na membrana plasmática. Tais fossas possuem uma cobertura protéica fibrosa de clatrina na sua superfície mais interna. Tal região invagina-se formando uma vesícula ou endossomo denominada de CURL (compartimento de separação do receptor e do ligante) (SMITH, 1989). Dentro da vesícula formada ocorre a redução do pH, fazendo com que a transferrina perca a afinidade pelo ferro, liberando-o. O ferro liberado no endossomo é transportado para o citosol pela DMT-1, podendo ser utilizado em proteínas celulares, armazenado na forma de ferritina ou hemossiderina ou servindo como regulador dos níveis de ferro, enquanto a apotransferrina (transferrina sem ferro) e o receptor (TfR) retornam à superfície celular para serem reutilizados (FAIRBANKS, 1994; ANDREWS, 1999; ANDREWS & SMITH, 2000). Os receptores da transferrina são expressos em todas as células, com exceção dos eritrócitos maduros, sendo as maiores concentrações encontradas nas células responsáveis pela síntese de hemoglobina, placenta e células que se dividem rapidamente (MONTEIRO et al. 2006).

Os receptores (TfR) são encontrados em estado solúvel no soro humano, tendo sua concentração correlacionada ao conteúdo dos receptores expressos nas células. Quando diminui o aporte de ferro para as células, ocorre um aumento da síntese com a conseqüente elevação da expressão de TfR na superfície dessas. A concentração do TfR pode ser mensurada, podendo ser usada como um bom indicador na detecção de deficiência de ferro, mesmo na ausência de anemia (PAIVA et al., 2000; GIANNETTI et al., 2003; CALZOLARI et al., 2004). Segundo Paiva et al. (2000) há boa correlação desses receptores com outros parâmetros do *status* férrico, como ferro sérico, ferritina e capacidade total de ligação do ferro.

O ferro utilizado para a formação da hemoglobina está constantemente sendo reutilizado, uma vez que os eritrócitos senescentes são fagocitados pelos macrófagos do sistema retículo endotelial. Esse ferro liberado no citoplasma dos macrófagos é oxidado pela ação ferroxidase da ceruplasmina sendo exportado pela ferroportina. Os macrófagos também podem utilizar o ferro ligado à transferrina, transportá-lo através da membrana endossomal utilizando a via DMT-1 e incorporá-lo como ferritina (FLEMING e SLY, 2001; GANZ, 2003; BARRIOS et al., 2005).

### 2.1.6 Reservas do Ferro

O ferro é armazenado no organismo, principalmente em duas formas: ferritina e hemossiderina, sendo esta última uma forma insolúvel em água, mais estável e menos reutilizada (ANDREWS & SMITH, 2000). Em mamíferos, a concentração de ferro armazenado é o principal fator a desencadear a distribuição de ferro entre a ferritina e a hemossiderina, sendo que em níveis baixos de armazenagem, mais ferro é armazenado em forma de ferritina (TORRANCE & BOTHWELL, 1980), Conforme os níveis do ferro aumentam, aumenta também a proporção da hemossiderina. Os locais de maior concentração de ferro no organismo são o fígado e o baço, seguidos pelo rim, coração, músculos esqueléticos e cérebro (UNDERWOOD, 1977). Essas duas formas de armazenagem do ferro estão disponíveis para o organismo (SMITH, 1997)

Pequenas quantidades de ferritina circulam no plasma e a determinação da sua concentração está relacionada com os níveis de depósito de ferro no organismo. Quando sua concentração está abaixo dos valores normais é indicativo de uma depleção nas reservas desse metal. Por outro lado, concentrações elevadas aparecem quando há excesso dessas reservas no organismo e em condições inflamatórias. Durante a fase aguda dos processos inflamatórios, citocinas estimulam a síntese de ferritina, sugerindo uma relação entre estados inflamatórios e/ou infecciosos na regulação desta proteína (PAIVA et al., 2000; TORTI e TORTI, 2002; YOU e WANG, 2005).

Watanabe et al. (2000) demonstraram que a ferritina sérica dos cães é composta predominantemente pela unidade H, diferenciando-na da ferritina humana, que apresenta apenas traços desta subunidade. Um anticorpo anti-ferritina atua como uma proteína de ligação à ferritina, evidenciando-se que a ferritina sérica do cão age como um complexo imunológico (WATANABE et al. 2000), enquanto a ferritina sérica humana parece não possuir esta ação. Estudos mais recentes apresentaram o seqüenciamento das subunidades H e L de cães evidenciando uma alta homologia entre a ferritina canina e humana, 96% da unidade H e 86% da unidade L (ORINO et al. 2005).

Quando ocorre aumento na demanda de ferro, aumenta também a síntese dos receptores da transferrina, enquanto a síntese de ferritina é diminuída. Por sua vez, quando o ferro está em excesso, ocorre o inverso, uma diminuição na síntese

de receptores da transferrina e um aumento na síntese de ferritina, diminuindo a concentração do ferro livre (HARVEY, 1997).

A outra forma de armazenagem do ferro é como hemossiderina, uma forma insolúvel em água, visualizada na microscopia óptica em exames histológicos.

### 2.1.7 Fisiologia da Regulação

A síntese de ferritina e a expressão de TfR são reguladas pelos níveis intracelulares de ferro, mediada pela interação de elementos responsivos ao ferro (IREs) com as proteínas regulatórias do ferro (IRPs). Esta interação é responsável por mudanças na captação, utilização e armazenagem do ferro intracelular a nível genético. Quando elevam-se os níveis de ferro, não ocorre a ligação dos IREs às IRPs e a tradução do mRNA da ferritina ocorre normalmente, induzindo à síntese da ferritina e seu estoque no organismo. Por outro lado, em estados de deficiência de ferro ocorre a ligação da IRP ao IRE, levando à inibição da tradução do mRNA da ferritina. Essa deficiência resulta também na ligação de IRP ao IRE na 3'UTR do mRNA do receptor de transferrina e na inibição da degradação do seu mRNA. Com a degradação diminuída do seu mRNA ocorre o aumento da expressão do TfR na membrana das células, com conseqüente elevação da captação de ferro pelas mesmas. O aumento desse pool de ferro inativa as IRPs. (FEELDERS et al., 1999; PAPANIKOLAOU e PANTOPOULOS, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Esse sistema IRE-IRP controla também a aquisição de ferro nas células intestinais e seu armazenamento, através da modulação de proteínas transportadoras como a DMT1 e a ferroportina, a partir da membrana basolateral dos enterócitos.

Recentemente foi descrito um peptídeo, a hepcidina, que tem um importante papel como regulador negativo na absorção de ferro no intestino e na liberação do mesmo pelos macrófagos (LAFTAH et al., 2004; RIVERA et al., 2005). Este peptídeo parece regular a absorção intestinal de ferro, através do controle da expressão da ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos. As concentrações reduzidas de hepcidina estimulam a absorção de ferro pelas células intestinais bem como a expressão da ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos. Desta forma ocorre o estímulo do transporte do ferro para a transferrina na corrente circulatória aumentando a liberação deste metal a partir dos macrófagos do sistema retículo-

endotelial. Quando a secreção de hepcidina aumenta, desencadeia uma reação inversa (GANZ, 2005; PAPANIKOLAOU e PANTOPOULOS, 2005).

A interação entre a hepcidina e a ferroportina provavelmente leva ao acúmulo de ferro nos enterócitos, uma vez que a ferroportina é internalizada e degradada dentro dessas células, diminuindo a transferência deste nutriente para a corrente circulatória. Assim, a hepcidina atua como um regulador negativo da absorção de ferro (TESTA, 2002; ANDREWS, 2005; GANZ, 2005).

Entre os principais mecanismos de controle da homeostasia do ferro está a regulação da entrada do metal nos enterócitos, a qual depende da disponibilidade do ferro na dieta e das reservas orgânicas (MONTEIRO et al., 2006)

## 2.2 ERITROPOESE

Denomina-se eritropoese o processo de formação dos eritrócitos na medula óssea a partir de células progenitoras. Os eritrócitos (do grego: *erythros*, vermelho), também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são as células mais numerosas do sangue. Em condições normais, correspondem por aproximadamente 40% do volume total sangüíneo (HARVEY, 1997). Nos cães, como em todos os mamíferos, eles possuem forma discóide ou esferóide, sem núcleo e com vida média de 110 dias (VACHA, 1983; CHRISTIAN, 2000).

A função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de gás carbônico no sentido inverso, que ocorre por intermédio de seu principal componente, a hemoglobina. A capacidade de transporte de oxigênio é diretamente proporcional à quantidade de hemoglobina, uma vez que ocorre através da ligação do oxigênio à essa molécula, estando intimamente ligada à presença do ferro (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Durante toda a vida, em condições normais de saúde, os eritrócitos são produzidos continuamente a partir de células tronco primitivas nos espaços extravasculares da medula óssea. Tais células, pluripotencial indiferenciadas, são capazes de se multiplicar, de se regenerar e de se diferenciar (HARVEY, 1997). A célula-tronco, ao dividir-se, origina duas células filhas: uma igual a si própria e outra chamada de unidade formadora de colônias ou UFC. A UFC dará origem às linhagens eritrocitária (UFCe), megacariocítica (UFCmg) e mielomonocítica (UFCmm). A divisão da UFCe não ocorre espontaneamente, mas depende da

presença de fatores específicos de crescimento hematopoiético e fatores de transcrição (CAR, 2000).

O principal fator de crescimento envolvido é a eritropoetina (Epo), hormônio produzido pelas células intersticiais peritubulares da porção interna do córtex renal e da porção externa da região medular (SEMENZA,1994) quando o organismo apresenta-se em condições de hipóxia tecidual (QUESENBERRY,1990). Durante o estágio fetal dos mamíferos, o fígado é o principal local de produção da Epo, podendo também ser um recurso, extra-renal, de produção nos adultos (SEMENZA, 1994; CAR, 2000). Quando secretado possui uma vida média de 6 a 10 horas. As modificações pós-translacionais da Epo são essenciais para a sua liberação e atividade (CAR, 2000).

### 2.2.1 Formação da hemoglobina

A hemoglobina é a cromoproteína dos eritrócitos. Proteína relativamente pequena, responsável por até 90% do peso seco do eritrócito adulto e por aproximadamente 1/3 do seu conteúdo celular (GARCIA-NAVARRO, 2005). Sua molécula é constituída por 4 cadeias polipeptídicas de globina (2  $\alpha$  e 2  $\beta$ ) e 4 núcleos prostéticos de heme (protoporfirina IX ligada ao Ferro), que ligam-se através de pontes que se abrem facilmente, permitindo a ligação com o oxigênio ou gás carbônico. Sua síntese acompanha o desenvolvimento dos eritrócitos na eritropoese, apresentando-se diminuída nos precursores mais jovens (rubroblastos), aumentando progressivamente com o desenvolvimento das células mais maduras (KANEKO, 2000)

As quatro cadeias protéicas de globina (2  $\alpha$  e 2  $\beta$ ) são sintetizadas nos ribossomos e polirribossomos no compartimento citoplasmático das células precursoras. Existem variações nas seqüências de aminoácidos destas cadeias polipeptídicas, fazendo com que haja diferentes moléculas de globinas entre as espécies, havendo, inclusive, uma diferenciação entre a produção fetal e adulta dentro da mesma espécie (KANEKO,2000).

O heme é uma molécula plana, composta por protoporfirina tetrapirrólica IX (PROTO IX), contendo uma molécula central de ferro, proveniente da ferritina. A síntese do grupamento heme é um processo enzimático que requer a participação tanto de enzimas mitocondriais como do citosol (KANEKO, 2000). Dentro da



mitocôndria celular ocorre a condensação do aminoácido glicina com a succinil-CoA, formando o ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). O ferro que se ligará ao grupo heme é proveniente da ferritina das células precursoras, onde é reduzido para a forma ferrosa e liberado da molécula de ferritina. Esse íon ferroso passa à mitocôndria aonde é quelado dentro do anel PROTO IX para formar o heme (KANEKO, 2000). Estando pronto, o heme passa para o compartimento citoplasmático para ligar-se à globina. O heme tem a sua síntese estimulada nos precursores mais jovens e inibida nos reticulócitos (ABRAHAM, 1991).

A síntese das moléculas de globina e do grupo heme acontece em sincronia, existindo pouco ou nenhum destes elementos livres no citoplasma dos precursores eritróides (KANEKO, 2000). Aparentemente, o heme é o fator controlador, uma vez que coordena a translação ribossomal da síntese de globina (TRAUGH, 1989; KANEKO, 2000).

A produção e maturação dos eritrócitos é um processo contínuo, que pode ser dividido em seis etapas sucessivas a partir da UFCe, cada uma delas constituindo um tipo celular: rubroblasto (pró-eritroblasto), pró-rubrócito (eritroblasto), rubrócito (normoblasto ortocromático), metarrubrócito (normoblasto metacromático), reticulócito e eritrócito maduro. À medida que as células vão se diferenciando, elas tornam-se menores, com maior condensação nuclear e com maior concentração de hemoglobina. A carência ou indisponibilidade do ferro resultarão em uma redução da produção das células eritróides, levando a um quadro de anemia.

### 2.2.2 Reticulócitos

Os reticulócitos são os eritrócitos imaturos liberados em maior quantidade pela medula óssea em resposta à anemia (WILLARD e TVEDEN, 2004). São formados a partir do amadurecimento do metarrubrócito, após a exclusão do seu núcleo, processo que inicia na medula óssea e termina no sangue periférico e baço nos cães. Aparecem como células não nucleadas, um pouco maiores que os eritrócitos maduros, com uma cor levemente azulada, quando corados pelos métodos de Wright ou Giemsa, sendo chamados de policromatófilo. Quando corados pelo corante novo azul de metileno, ou azul de cresil, observam-se grânulos precipitados em forma de retículos, fato que dá o nome de reticulócito à célula. Eles contêm ribossomos, polirribossomos e mitocôndria, o que os tornam capazes de

produzir até 20% da hemoglobina final (JAIN, 1983). Os reticulócitos podem permanecer na medula óssea por 2 ou 3 dias antes de fazerem diapedese através das células endoteliais que margeiam a medula óssea.

Segundo Rapoport, 1986, os reticulócitos jovens, imaturos, continuam a sintetizar proteínas com o RNAm, RNAt e RNAr residuais, formados antes da enucleação. Podendo sintetizar, ainda, os nucleotídeos adenina e guanina (KANEKO 2000).

O processo de maturação dos reticulócitos, tornando-os eritrócitos, é um processo gradual que requer dias, variando entre as diferentes espécies. Conseqüentemente, as suas propriedades morfológicas e fisiológicas variam conforme o estágio de maturação. A superfície celular sofre intensa remodelagem, com perda de material da membrana e por fim, tem-se a formação da forma côncava das células vermelhas (BESSIS, 1973). A perda de proteína da membrana e de componentes lipídicos envolve a formação intracelular de corpúsculos multivesiculares que se fundem à membrana plasmática e liberam exossomos extracelulares (HARVEY, 1997). Conforme ocorre a maturação, há a perda de receptores de superfície necessários à adesão aos componentes da matriz extracelular, facilitando, assim, a sua saída da medula óssea (LONG e DIXIT, 1990). Os reticulócitos tornam-se também mais deformáveis. Poros pequenos e finos no citoplasma desenvolvem-se nas células endoteliais permitindo que os reticulócitos sejam empurrados através da parede por um pequeno gradiente de pressão.

Os reticulócitos são maiores do que os eritrócitos e apresentam uma menor concentração de hemoglobina, desta forma, a macrocitose e a anemia macrocítica e hipocrômica refletem indiretamente a reticulocitose e a resposta da medula óssea (WILLARD e TVEDEN, 2004). A quantificação dos reticulócitos no sangue é a forma mais consistente para avaliar a intensidade da eritropoese e está indicada quando os valores de hematócrito estiverem abaixo de 30% (WILLARD e TVEDEN, 2004) são utilizadas a porcentagem de reticulócitos, o número absoluto de reticulócitos por microlitro de sangue, o índice de reticulócitos, a porcentagem de reticulócitos corrigida e a observação e quantificação de policromatófilos no esfregaço sanguíneo (WILLARD e TVEDEN, 2004).

### 2.2.2.1 Porcentagem de reticulócitos

A porcentagem de reticulócitos é obtida na contagem de 1000 eritrócitos, no esfregaço preparado com a mistura de 1:1 de sangue total com o corante vital. Este valor, entretanto, pode ser ilusório uma vez que nas anemias os eritrócitos maduros estão em número reduzido e assim a porcentagem de reticulócitos terá valores que superestimam a resposta hematopoiética (JAIN,2000; WILLARD e TVEDEN, 2004).

### 2.2.2.2 Contagem absoluta de reticulócitos

A contagem absoluta de reticulócitos é obtida pela multiplicação do número percentual de reticulócitos pelo número total de eritrócitos, portanto, varia com a severidade da anemia (JAIN,2000; WILLARD e TVEDEN, 2004).

Pode-se classificar o grau de regeneração eritrocitária conforme a contagem relativa e absoluta de reticulócitos (Tabela 1).

TABELA 1: GRAUS DE REGENERAÇÃO COM BASE NA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (RELATIVA E ABSOLUTA)

GRAU DE REGENERAÇÃO	RETICULÓCITOS % (Relativa)	NR DE RETICULÓCITOS / $\mu$ l (Absoluta)
Nenhuma	1	60.000
Leve	1 a 4	150.000
Moderada	5 a 20	300.000
Acentuada	21 a 50	> 500.000

FONTE: TVEDTEN e WEISS (2000)

### 2.2.2.3 Índice de reticulócitos e porcentagem de reticulócitos corrigida

A porcentagem de reticulócitos é corrigida conforme o grau da anemia. O valor do hematócrito do paciente é dividido pelo valor médio do hematócrito de referência normal (45), multiplicando-se pelo percentual de reticulócitos. Para a obtenção do índice de reticulócitos utiliza-se o tempo esperado para a sua maturação no sangue, expressa em dias. Quanto mais severa a anemia, mais precoce é a liberação de reticulócitos pela medula óssea, aumentando, assim, o tempo de maturação destas células no sangue (TABELA 2) (WILLARD e TVEDEN, 2004).

TABELA 2 : MATURAÇÃO ESPERADA DOS RETICULÓCITOS CONFORME A DIMINUIÇÃO DO HEMATÓCRITO

HEMATÓCRITO %	MATURAÇÃO DOS RETICULÓCITOS (DIAS)
45	1,0
35	1,5
25	2,0
15	2,5

FONTE: WILLARD e TVEDEN (2004)

A porcentagem corrigida de reticulócitos dividida pelo tempo esperado de maturação fornece o índice de reticulócitos. Índices com valores menores ou iguais a 1 indicam a presença de uma anemia não regenerativa. Os valores acima de 1 indicam variáveis graus de regeneração dependendo do valor do índice: de 1 a 2 = regeneração leve; maior que 2 = eritropoese acelerada; maior ou igual a 3 = regeneração intensa (WILLARD e TVEDEN, 2004).

Estudos recentes têm indicado a importância do conhecimento dos índices de reticulócitos no diagnóstico e monitoramento da deficiência de ferro em cães . Fry e Kirk (2006) compararam os índices de reticulócitos com índices hematológicos e bioquímicos convencionais para o diagnóstico de deficiência de ferro, em um modelo experimental de cães que desenvolveram anemia ferropriva após terem sido submetidos a uma dieta carente em ferro. Tais animais tiveram a dieta corrigida com teores normais de ferro e também receberam administração parenteral deste mineral. As variações nos índices de reticulócitos são mais pronunciadas do que as variações hematológicas e bioquímicas convencionais, além de serem mais precocemente detectados em alguns casos. O conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos (CHr) é um outro índice que tem se mostrado eficiente marcador do estado geral do ferro, usado no diagnóstico precoce da deficiência de ferro e nas deficiências de ferro mascaradas por doenças concomitantes (STEINBERG E OLIVER, 2005). Neste estudo, os autores mostram que os valores de CHr e rMCV (volume de reticulócitos) reduzidos, estão associados a alterações hematológica e bioquímicas, indicativas de deficiência de ferro.

## 2.3 ANEMIA

A anemia é um estado mórbido onde ocorre a diminuição da capacidade do sangue em suprir os tecidos com as quantidades adequadas de oxigênio, necessárias à função metabólica apropriada (AIRD, 2000). É a desordem eritrocitária

mais comum. Ela é caracterizada pela diminuição na massa de eritrócitos, expressa pelo número de hemácias circulantes, do hematócrito (HT) e da hemoglobina (Hb) abaixo dos valores de referência (Tabela 3). As três causas básicas da anemia são: a) diminuição da produção de eritrócitos pela medula óssea; b) perda sangüínea extra corpórea; c) destruição sangüínea dentro do organismo (WILLARD e TVEDTEN, 2004). Uma vez estabelecido o seu diagnóstico, torna-se essencial determinar os seus fatores etiológicos, para que seja estabelecido o tratamento mais adequado.

TABELA 3- VALORES DE REFERÊNCIA DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DO CÃO

ÍNDICES / IDADE	FILHOTES 2 MESES	FILHOTES 4-6 MESES	ADULTOS
Eritrócitos / $\mu$ l em milhões	4,3 – 5,1	6,1 – 7	5,5 - 8,5
Hematócrito em %	29 – 33,8	41,6 – 46,4	37 - 55
Hemoglobina em g%	9,4 – 11,2	13,6 – 15,2	12 - 18
VGM em $\mu$ m <sup>3</sup>	63,5 – 68,1	64,3 – 70,1	60 - 77
CHGM em %	30,8 – 34,4	32,1 – 33,3	31 - 36

FONTE: JAIN (1993)

Os sinais clínicos de uma anemia resultam da diminuição da capacidade de transporte de oxigênio, do volume sangüíneo reduzido, da doença primária e dos ajustes realizados para aumentar a eficiência dos eritrócitos. A gravidade dos sinais depende da velocidade do desenvolvimento, do grau e da causa da anemia, bem como do grau de atividade física do animal (ETTINGER e FELDMAN, 2004). Os sinais clínicos comuns nas anemias incluem palidez das mucosas, intolerância a exercícios, aumento da frequência cardíaca, dispnéia, taquipnéia, depressão (JAIN 2000). Nos casos de perdas excessivas de sangue, quando um terço do volume sangüíneo é perdido em um curto período de tempo, o paciente pode entrar em um quadro de choque. Os sinais clínicos estão relacionados à origem e patogênese da doença (JAIN, 2000).

Com base nos valores do hematócrito, a anemia pode ser graduada como: leve (30 a 37), moderada (20 a 29), severa (13 a 19) e muito severa (inferior a 13). Detectada a anemia e sua severidade, é necessário avaliar a produção eritrocitária pela medula óssea feita pela contagem de reticulócitos. Pode-se classificar o grau de regeneração eritrocitária conforme a contagem de reticulócitos (Tabela 1).

Uma das formas de classificação das anemias baseia-se na resposta da medula óssea, dividindo-as em duas categorias: regenerativas e não regenerativas. As anemias regenerativas ocorrem devido a uma perda aumentada de eritrócitos,

mantendo-se normal a sua produção, ou seja, há evidências de que a medula óssea está respondendo à diminuição do hematócrito. Nas anemias não-regenerativas ocorre o inverso, isto é, há uma diminuição da produção dessas células, associada a uma perda das mesmas em quantidades normais (GARCIA-NAVARRO, 2005). Embora as anemias por deficiência de ferro (ADF) sejam tradicionalmente classificadas como não-regenerativas, a maioria dos caninos com deficiência de ferro resultante da perda crônica de sangue apresentam um grau leve a moderado de regeneração, desta forma a ADF pode estar classificada em uma categoria intermediária, como semi-regenerativa (COUTO, 2006). Via de regra, as anemias regenerativas apresentam um curso agudo, enquanto as anemias não regenerativas são peragudas (hemorragia e hemólise com menos de 48 horas) ou crônicas (COUTO, 2006). Uma proposta das principais causas dessas anemias estão relacionadas no Quadro 1.

REGENERATIVA	SEMI-REGENERATIVA	NÃO-REGENERATIVA
ANEMIA HEMORRÁGICA (após 48-96 horas) Perdas Externas , Perdas Internas Por Deficiência de ferro	ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO	HEMORRAGIA/HEMÓLISE (primeiras 48-96 horas) ANEMIA DA DOENÇA CRÔNICA Anemia da Resposta Inflamatória Anemia da Doença Hepática ANEMIA DA DOENÇA RENAL ANEMIA ENDÓCRINA Hipotireoidismo
ANEMIA HEMOLÍTICA Anemia Hemolítica Autoimune (AHA) Doença da Hemoaglutinina fria Parasitas sangüíneos <i>Mycoplasma canis</i> <i>Babesia canis</i> Anemia hemolítica tóxica – Zinco ou Cobre Anemia hemolítica hereditária		DESORDENS DA MEDULA ÓSSEA Aplasia de células vermelhas Leucemia Síndrome mielodisplásica
		ANEMIA POR AGENTES QUÍMICOS Toxicidade ao Estrógeno
		INFECÇÕES <i>Ehrlichia</i>

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO PATOGENÉTICA DAS ANEMIAS EM CÃES

FONTE: ADAPTADO DE COUTO (2006); WILLARD e TVEDTEN (2004)

### 2.3.1 Anemia Regenerativa

São causadas por um aumento na perda de eritrócitos e compreendem dois grupos: as hemorrágicas (causadas por hemorragias crônicas) e as hemolíticas (causadas pelo aumento na taxa de hemólise). Vários são os fatores causadores destas anemias em cães (Quadro 1). Em ambos os casos, a medula óssea reage

com um aumento na eritropoese, caracterizando um aumento no número de reticulócitos circulante (TVEDTEN & WEISS, 2000).

Com base nos índices hematimétricos, classificam-se como microcíticas hipocrômicas do ponto de vista morfológico, pois apresentam um volume globular médio (VGM) e uma hemoglobina globular média (CHGM) baixos, devido a diminuição da hemoglobina existente nas hemácias (GARCIA-NAVARRO, 2005).

Anemias leves (HT 30-37%) podem não estimular a reticulocitose, devido à medula óssea responder a um estímulo discreto com a liberação de eritrócitos maduros (WILLARD e TVEDTEN, 2004). Condições anêmicas com regeneração leve a moderada devem ser interpretadas quanto à duração, severidade e multiplicidade das causas. Um exemplo disto é a neoplasia intestinal, a qual possui diversos fatores causais levando à anemia. Uma hemorragia intestinal resulta em perda corpórea de sangue. A anemia, inicialmente, tem boa resposta regenerativa, no entanto, um sangramento persistente leva a uma deficiência de ferro e proteína. Além disso, a presença freqüente de inflamação da neoplasia interfere na eritropoese, resultando na produção deficiente de eritrócitos. Sendo assim, o grau de regeneração pode variar e ser menor do que o esperado (WILLARD e TVEDTEN, 2004). Graus acentuados de regeneração (>500.000 reticulócitos/ $\mu$ l) normalmente estão presentes em cães com anemia hemolítica, hemorragias internas ou perdas recentes de sangue (WILLARD e TVEDTEN, 2004).

Os sinais clínicos aparentes estão relacionados à origem e patogênese da causa primária (QUADRO 2).

SINAIS CLÍNICOS GERAIS	SINAIS SUGESTIVOS DE HEMORRAGIA	SINAIS SUGESTIVOS DE HEMÓLISE
Palidez	Hematêmese	Icterícia
Anorexia	Epistaxe	Hemoglobinemia
Letargia	Petéquias	Hemoglobinúria
Fraqueza	Equimoses	Esplenomegalia
Intolerância ao exercício	Melena	
Dispnéia / Taquipnéia	Hematomas	
Taquicardia	Hemartose	
Sopro		

QUADRO 2 – ACHADOS CLÍNICOS E FÍSICOS NA ANEMIA

FONTE: Adaptado de Aird (2000).

### 2.3.1.1 Anemia Hemorrágica

As perdas sangüíneas causadoras de anemia podem ser extra ou intracorpóreas. As extracorpóreas são de fácil visualização e diagnóstico, no entanto, as perdas no interior do trato gastrointestinal e intracavitárias podem permanecer ocultas (WILLARD e TVEDTEN, 2004). Durante as primeiras 48-96 horas de perda sangüínea, a anemia instalada não apresenta características de regeneração. Logo nas primeiras horas ocorre a esplenocontração com a liberação de eritrócitos para a circulação, podendo mascarar a severidade da anemia. A partir do terceiro dia começa a aumentar a liberação de reticulócitos, atingindo um pico de liberação durante o quarto e quinto dias (WILLARD e TVEDTEN, 2004).

Nos animais adultos, a hemorragia persistente por várias semanas causa uma deficiência de ferro e diminuição na concentração protéica, prejudicando a eritropoese e levando a uma fraca resposta regenerativa.

Desta forma, a anemia por hemorragia aparece inicialmente com uma reposta pré-regenerativa, torna-se regenerativa e pode ser não-regenerativa devido a deficiência de ferro (WILLARD e TVEDTEN, 2004).

### 2.3.1.2 Anemia Hemolítica

O diagnóstico clínico da anemia hemolítica, normalmente é feito pelo acentuado perfil regenerativo da anemia sem sinais de hipoproteinemia ou outras perdas sangüíneas (WILLARD e TVEDTEN, 2004). Deve-se proceder a avaliação criteriosa do esfregaço sangüíneo para a identificação das causas específicas da anemia, como parasitas sangüíneos, corpúsculos de Heinz ou processo imunomediado.

As anemias hemolíticas podem ser classificadas em extravascular e intravascular. A hemólise extravascular é resultante da destruição eritrocitária pelos macrófagos no baço, fígado e medula óssea, desencadeada pelas inclusões eritrocitárias como os hemoparasitas ou corpúsculos de Heinz (especialmente nos gatos) e membrana coberta por imunoglobulina Ig) G ou M (COUTO, 2006). A hepatomegalia e esplenomegalia são evidências deste tipo de hemólise.

A hemólise intravascular indica uma anemia aguda e severa. Processo onde ocorre a destruição das hemácias por anticorpo-complemento (hemólise



imunomediada), fármacos ou toxinas (produtos a base de zinco), agentes infecciosos (babesiose), distúrbios metabólicos ou aumento da espoliação de hemácias (coagulação intravascular disseminada - CID) (COUTO, 2006). Os achados diagnósticos da hemólise intravascular incluem a presença de hemoglobinúria com hemoglobinemia e presença de eritrócitos lisados no esfregaço sanguíneo (WILLARD e TVEDTEN, 2004). A hemólise intravascular é menos comum do que a extravascular, com a exceção da CID em cães com hemangiossarcoma e toxicidade por zinco (COUTO, 2006).

As principais formas de anemia hemolítica estão apresentadas no Quadro 1.

### 2.3.2 Anemia Não Regenerativa

São também chamadas de anemias aplásicas e apresentam-se como anemias normocíticas normocrômicas. São causadas por uma hipoplasia eritrocitária, ou seja, diminuição na produção de eritrócitos. As principais causas das anemias não regenerativas em cães estão apresentadas no Quadro 1.

Muitas das anemias não-regenerativas são de grau leve a moderado e são complicações secundárias de doenças sistêmicas, especialmente de doenças inflamatórias e neoplasias.

A maioria das anemias não-regenerativas é crônica, permitindo a adaptação fisiológica para a diminuição da massa eritrocitária. Conseqüentemente, podem ser detectadas incidentalmente durante a avaliação de um paciente assintomático (COUTO, 2006).

#### 2.3.2.1 Anemia da Resposta Inflamatória

A anemia da resposta inflamatória é uma desordem adquirida, comumente observada em pacientes com processos inflamatórios, infecções crônicas, traumas e neoplasias (FELDMAN et al, 1981). Tem sido muito estudada, por se tratar do principal tipo de anemia encontrado em pequenos animais e seguramente, a principal anemia encontrada em toda a medicina veterinária (WANER & HARRUS, 2000). A anemia é produzida devido a uma redução na viabilidade do ferro, diminuição na sobrevivência eritrocitária e redução da eritropoese, desencadeados pelas citocinas liberadas durante a inflamação (LEE, 1983). Os processos inflamatórios ou

neoplásicos fazem o seqüestro de ferro do sistema monocítico fagocitário (SMF) na medula óssea, tornando-o indisponível para os precursores eritróides. Este processo é mediado pela lactoferrina e outras proteínas de fase aguda liberadas durante a inflamação pela ação de citocinas como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) entre outros (GABAY & KUSHNER, 1999).

Apresenta-se como uma anemia normocítica normocrômica de grau leve a moderado, caracterizada por níveis de ferro e capacidade de ligação de ferro total (CLFT) reduzidos, ferritina aumentada e presença de ferro nos compartimentos de reserva no fígado e medula óssea (CARTWRIGHT, 1966).

Os índices hematimétricos e os índices do ferro auxiliam na diferenciação deste tipo de anemia da anemia por deficiência de ferro (QUADRO 3). O hemograma também pode refletir a natureza da causa primária (COUTO, 2006). Os índices de ferro na medula óssea propiciam uma avaliação acurada da reserva de ferro no organismo, no entanto, trata-se de um exame invasivo. Desta forma, pode se utilizar a dosagem de ferritina para se obter esta acurácia com um método não invasivo (STONE & FREDEN, 1990).

<b>Parâmetros</b>	<b>Anemia por deficiência de ferro</b>	<b>Anemia da resposta inflamatória</b>
Índices hematimétricos	Microcítica hipocrômica	Normocítica normocrômica
Ferro sérico	Diminuído	Diminuído a normal
Capacidade Ligadora de Ferro – Transferrina	Elevada	Normal a diminuída
Ferritina	Baixa	Normal a aumentada
Reserva na medula óssea	Baixa	Normal a aumentada

QUADRO 3 - DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FERRO E ANEMIA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
FONTE: WANER E HARRUS (2000)

### 2.3.3 Anemia Por Deficiência De Ferro

A deficiência de ferro é considerada a deficiência nutricional mais comum no ser humano ao redor do mundo (HALBERG, 2001). Segundo Umbelino e Rossi (2006) cerca de cinco bilhões de pessoas no mundo possuem deficiência de ferro,

sendo que metade apresenta-se anêmica. Nos animais domésticos não aparece tão comumente como no homem, mas pode ocorrer afetando significativamente tanto a saúde como a performance dos mesmos (SMITH, 1989). Pode-se distinguir diferentes categorias de animais com deficiência de ferro: pacientes com deficiência de ferro, mas não anêmicos (possuem a ferritina sérica diminuída) e pacientes com anemia ferropriva (FINCH E COOK, 1984).

Em cães, a deficiência de ferro de origem nutricional é rara (JAIN, 2000). No entanto, a forma mais comum de deficiência de ferro nos animais domésticos, conseqüentemente nos cães, é a anemia ferropriva (SMITH, 1989). Harvey, French e Meyer relataram que cerca de 11% dos animais anêmicos na Flórida possuíam anemia ferropriva (WILLARD e TVEDTEN, 2004)

Dependendo do estágio da doença, os pacientes com deficiência de ferro irão apresentar desde uma anemia normocítica normocrômica a uma anemia microcítica hipocrômica. Nessas últimas, o número de reticulócitos circulante está aumentado, indicando um processo de regeneração medular. Como nestes casos a deficiência de ferro é geralmente ocasionada pela perda crônica de sangue em animais adultos, observa-se inicialmente a policromatofilia, característica de regeneração. No entanto, à medida que a deficiência de ferro aumenta, a anemia vai tornado-se não regenerativa (JAIN, 2000). Diante desta característica, Couto (2006) a classifica como uma anemia semi-regenerativa.

As perdas sangüíneas crônicas podem ocorrer pela presença de parasitas hematófagos em áreas de infestações severas e é comum em cães com hemorragia do trato gastrointestinal causada por neoplasias, úlceras gástricas ou endoparasitas (HARVEY et al., 1982; HARVEY, 2000, COUTO, 2006). Segundo Couto (2006) a causa mais comum da anemia ferropriva sintomática em cães é a neoplasia gastrointestinal. Anemias provenientes de processos inflamatórios têm sido consideradas como uma conseqüência da resposta de fase aguda, e a diminuição das concentrações da transferrina e do ferro sérico e o aumento das concentrações da ferritina têm sido encontradas neste processo (ECKERSALL, 1995).

Os sinais clínicos e achados físicos dependem das causas da anemia e da presença de outras alterações concomitantes, mas geralmente apresentam-se como palidez de mucosas, letargia, fraqueza, perda de peso, diarréia, dermatites, hematúria, hematoquezia e melena (HARVEY, 2000).

Na deficiência aguda de ferro, geralmente, o volume globular médio (VGM) está normal. Se a deficiência torna-se persistente por semana e meses, aumenta o número de células microcíticas reduzindo o VGM abaixo dos valores de referência. A anemia ferropriva crônica é definida como uma deficiência de ferro que resulta em anemia microcítica (HARVEY, 2000). A concentração média de hemoglobina (CHGM) pode estar baixa nos eritrócitos com deficiência de ferro porque o ferro é necessário para a síntese da hemoglobina normal. Segundo Harvey (2000), esta é uma condição comum em cães. Os eritrócitos de cães com anemia ferropriva freqüentemente aparecem hipocrômicos nos esfregaços sangüíneos.

Na anemia ferropriva crônica o ferro sérico apresenta-se com valores reduzidos (SMITH, 1997; HARVEY, 2000), enquanto a capacidade ligadora do ferro mostra valores dentro da normalidade ou um pouco elevados (HARVEY et al., 1982). A ferritina também aparece reduzida (SMITH, 1997). Os índices eritrocitários e os índices do ferro auxiliam na diferenciação da anemia por deficiência de ferro da anemia da resposta inflamatória (QUADRO 3). As anormalidades hematológicas típicas em cães com anemia ferropriva são a microcitose, hipocromia, regeneração discreta e trombocitose (COUTO, 2006).

O tratamento das anemias ferroprivas consiste na eliminação das causas primárias de perdas sangüíneas, quando possível, neste caso a anemia desaparece em seis a oito semanas. A suplementação com ferro oral ou intravascular normalmente não é necessária para o restabelecimento das anormalidades hematológicas, mas deve ser fornecida uma dieta adequada (COUTO, 2006). A necessidade dietética de ferro para os cães é de aproximadamente 1,3mg/kg /dia. No caso de suplementação oral, o ferro pode ser administrado como sulfato ferroso na dose diária de 15 mg/kg dividido em três doses (HARVEY et al., 1982; HARVEY, 2000). A suplementação oral é a via preferencial para cães, mas complexos carbohidratados de ferro podem ser administrados via parenteral além da transfusão sangüínea em casos de anemia severa (HARVEY, 2000). A suplementação de ferro deve continuar até que os parâmetros de hematócrito e VGM alcancem valores normais, podendo levar alguns meses. A absorção de ferro da dieta normalmente está aumentada durante a deficiência de ferro, no entanto, pode estar diminuída em animais com uma deficiência muito severa, sendo necessária a administração intramuscular de 10-20 mg/kg (HARVEY et al., 1982; HARVEY, 2000).

## 2.4 ANÁLISES LABORATORIAIS PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO

A capacidade de monitoramento do metabolismo do ferro aumentou muito nos laboratórios de análises clínicas nas últimas décadas com a utilização de novos métodos laboratoriais, diminuindo a necessidade de procedimentos invasivos como o exame da medula óssea (MONTEIRO et al., 2006). Como atualmente chega-se a um diagnóstico mais preciso, tem-se buscado a detecção dos estados subclínicos da deficiência do ferro. Associado aos valores hematológicos é necessário avaliar o ferro nas suas três principais frações: ferro sérico, transferrina e ferritina.

Identificar a deficiência de ferro no compartimento funcional é um procedimento fácil, no entanto torna-se difícil identificar o déficit sem a presença de anemia, na chamada eritropoese ferro-deficiente (MONTEIRO et al., 2006).

Os testes laboratoriais utilizados para a avaliação do *status* do ferro serão descritos a seguir:

### 2.4.1 Hematologia

Os exames hematológicos (contagem total de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e contagem de leucócitos) podem avaliar a adequação de ferro de forma preliminar, uma vez que o sangue possui o maior *pool* de ferro do organismo, dentro da hemoglobina. No entanto, ela é a última fração a mostrar algum sinal de depleção de ferro pois todos os demais compartimentos priorizam o envio desse metal à eritropoese (SMITH, 1989; JAIN, 2000).

Os índices hematimétricos usados na rotina clínica são: o volume globular médio ou VGM e a concentração de hemoglobina globular média ou CHGM.

O VGM indica o volume médio dos eritrócitos, seu valor de referência para os cães adultos é de 60 – 77 fl (JAIN, 2000), quando este índice encontra-se abaixo dos valores de referência, determina uma microcitose, indicando uma deficiência de ferro para a formação de nova hemoglobina. O VGM aumentado representa uma macrocitose, a qual aparece nos processos de regeneração intensa, com o aparecimento de um grande número de reticulócitos (policromatófilos) na circulação.

O CHGM indica a porcentagem média de hemoglobina por hemácia e geralmente acompanha o VGM. Quando ocorre a microcitose por falta de

hemoglobina, os eritrócitos também são hipocrômicos, tendo a CHGM diminuída. Os valores médios de CHGM para o cão são de 32 – 36 % (JAIN, 2000).

A hemoglobina é determinada por meio de contadores eletrônicos pelo método da cianometahemoglobina. A literatura traz valores norteamericanos que variam de 12 a 18 g/dl nos cães adultos; de 9,4 a 11,2 g/dl em Beagles com dois meses de idade e de 13,6 a 15,2 g/dl em cães da raça Basengi com 4 a 6 meses de idade (JAIN, 2000).

As análises hematológicas hoje são ferramentas comuns na rotina médico veterinário quer seja para avaliações diagnósticas quer seja para uso em pesquisas (KNOLL, 2000).

#### 2.4.2 Dosagem do Ferro Sérico

A mensuração do ferro sérico permite acessar o compartimento de transporte do ferro. Ela é feita pela utilização de provas colorimétricas, onde ocorre a redução do pH, reduzindo  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  fazendo sua separação da transferrina. Recomenda-se a utilização de frascos plásticos descartáveis ou a cuidadosa limpeza da vidraria utilizada com solução ácida, afim de não haver a interferência de ferro do meio externo no resultado da análise.

A técnica utiliza o soro, o qual deve ser separado dos glóbulos o mais rápido possível. No soro, os íons de  $\text{Fe}^{+3}$  são estáveis por 4 dias à temperatura ambiente ou por 6 dias entre 2 a 8°C.

Os níveis normais de ferro sérico para cães, segundo a literatura são de 76 - 124µg/dl (WEEKS et al., 1988).

Os níveis séricos de ferro aparecem reduzidos na deficiência severa de ferro, nas reações inflamatórias de fase aguda, na hipoproteinemia, no hipotireoidismo, na doença renal e nas inflamações crônicas. Apresentando-se elevados nas anemias hemolíticas e doença hepática (KANEKO, 1980)

#### 2.4.3 Capacidade Ligadora do Ferro (Transferrina)

A transferrina é mensurada em termos do conteúdo de ferro ligado, depois de ter sido saturada com este metal. Após esta saturação o conteúdo de ferro da transferrina é expresso como a capacidade ligadora do ferro (CLF). A CLF somada

ao ferro sérico revela a CTLF (capacidade total de ligação do ferro). Como a transferrina pode ligar mais moléculas de ferro do que está presente normalmente, a CTLF é maior do que o ferro sérico. A diferença entre eles é tida como a capacidade latente de ligação do ferro (CLLF). A CTLF pode ser traduzida como a transferrina livre, disponível para ser ligada ao ferro.

Existem diversas técnicas utilizadas para a determinação da capacidade ligadora do ferro, a maioria é determinada por reação colorimétrica.

Os valores normais da CTLF na literatura são de 308 – 360 µg/ dl para cães adultos norte-americanos (WEEKS et al. 1988; SMITH, 1997).

Pode ser obtido também, o índice de saturação da transferrina (IST). Este índice é a razão do ferro sérico pela CTLF, multiplicado por 100.

Mais recentemente, foram introduzidos os receptores séricos de transferrina (sTfR) como um meio promissor para diagnosticar deficiência de ferro. Os níveis destes receptores são considerados os indicadores mais sensíveis da depleção do compartimento funcional e são úteis no diagnóstico diferencial de vários tipos de anemias microcíticas. Os sTfR são quantificados usando ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) com anticorpos monoclonais (LIEU et al., 1999; PAIVA et al., 2000).

#### 2.4.4. Ferritina Sérica

As técnicas para a determinação da ferritina sérica são reações dirigidas por anticorpos, como Radioimunoensaio, ELISA e Quimioluminescência. Os anticorpos contra a ferritina são espécie-específicos, significando que para cada espécie, deve-se isolar a ferritina, um anticorpo deve ser produzido, e a técnica deve ser desenvolvida.

Em humanos a determinação da ferritina sérica auxilia o controle da recuperação dos depósitos de ferro em pacientes com administração oral de ferro e serve para indicar quando a terapia pode ser interrompida (COOK et al., 1980). Diversos estudos demonstraram, também, a utilidade e a necessidade da determinação da ferritina sérica junto com outros parâmetros, para determinar a intensidade e o grau da sobrecarga férrica do organismo em distúrbios como a talassemia e a anemia sideroblástica (HO, 2001; LIU e THEIL, 2005; TAHER et al. 2008). O uso combinado dos níveis de ferritina com os receptores da transferrina e demais parâmetros hematológicos tornam possível a diferenciação entre os

diferentes tipos de anemia, com uma precisão maior (HO, 2001). Sendo assim, a dosagem da ferritina é amplamente utilizada na medicina, sendo atualmente realizada pelos ensaios quimioluminescentes de diversos fabricantes distintos, disponíveis no Brasil.

Kits de ELISA, para a dosagem de ferritina sérica em cães já foram desenvolvidos (WEEKS et al.1988; ANDREWS et al. 1992; WATANABE et al. 2000). Até o momento, existem apenas dois grupos que fazem a determinação da ferritina canina com kits específicos para cães: a Universidade do Kansas, nos EUA e a Universidade de Kitasato, no Japão. Esta condição torna inviável a análise devido ao custo elevado, as dificuldades no envio da amostra e o tempo para processamento. Além desses fatores, os grupos trabalham com ferritina de origem diferentes. O grupo japonês purificou a ferritina proveniente do coração, rica em subunidade H (WATANABE et al., 2000) enquanto o outro grupo utilizou a ferritina do fígado, rica em subunidade L (ANDREWS et al., 1992). Segundo Watanabe et al. (2000) a ferritina sérica do cão é composta principalmente pela subunidade H, o que confere maior precisão à sua análise.

Os índices normais da ferritina no cão indicados pela literatura foram obtidos nos Estados Unidos pelo método de ELISA e variam de 36,4 – 117,0 ng/dl (WEEKS et al. 1988; SMITH , 1997).

#### 2.4.5 Citologia da Medula Óssea

A medula óssea pode ser examinada em extensões citológicas coradas com o azul da Prússia para detectar o ferro e avaliar desordens no seu metabolismo (HARVEY, 1981). Na medula óssea do cão adulto sadio pode-se visualizar o ferro corado (hemossiderina) dentro dos macrófagos, por sua vez, nos casos de deficiência de ferro visualiza-se pouco ou nenhum ferro corado. O ferro da mitocôndria dos precursores eritróides aparecem como agregados amorfos e são chamados de micelas ferruginosas (ANDREWS e SMITH, 2000). Nos esfregaços de medula, corados com azul da Prússia, de cães sadios, visualizam-se também alguns eritrócitos nucleados, contendo de um a três grânulos pequenos e azulados no seu citoplasma. Por outro lado, na deficiência de ferro esses grânulos não são visualizados (ANDREWS e SMITH, 2000)



A técnica da aspiração de medula óssea necessita de cuidados especiais para que a análise seja bem sucedida. Além do mais, na maioria das vezes o próprio clínico deverá realizar a extensão da lâmina, pois a viabilidade do material para a extensão é de até 1 hora após a coleta com anti-coagulante (FREEMAN, 2000). Na ausência de anti-coagulante o esfregaço deve ser realizado imediatamente após a coleta. Devem ser preparadas no mínimo duas lâminas para assegurar a viabilidade do material a ser analisado

Os índices de ferro na medula óssea propiciam uma avaliação acurada da reserva de ferro no organismo, no entanto, trata-se de um exame extremamente invasivo, doloroso, que requer treinamento do médico veterinário e da equipe para a contenção correta do paciente, muitas vezes necessita de uma sedação ou até de anestesia geral do paciente o que o torna um recurso ainda inviável na rotina clínica.

#### 2.4.6 Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos (Chr)

Novos estudos têm sido realizados para verificar a utilização de parâmetros reticulocitários como o conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos (CHr) e o volume médio de reticulócitos (VMCr) como índices do *status* do ferro em cães (STEINBERG e OLIVER, 2005).

As análises são efetuadas em equipamento automático ADVIA 120 (Bayer Diagnostics) de citometria de fluxo.

Em seres humanos, a avaliação do CHr tem mostrado sensibilidade na detecção da deficiência de ferro em pacientes com doença crônica. Como os reticulócitos circulam por 1 a 2 dias, esta análise indica a disponibilidade de ferro em tempo real, sendo também útil para monitorar a resposta à terapia com ferro (BHANDARI et al. 1997).

Para cães, esta análise ainda necessita de uma validação com métodos invasivos para acessar o ferro.

## 2.5 CONCLUSÕES

A anemia apresenta-se com grande prevalência na clínica de pequenos animais, independente dos fatores causadores, e está diretamente relacionada ao metabolismo do ferro. Os clínicos utilizam os valores hematológicos para o

diagnóstico e administram ferro sem as provas bioquímicas específicas. O monitoramento do metabolismo do ferro envolve vários processos complexos e importantes, e, quando pretende-se buscar um diagnóstico mais preciso e acurado das causas das anemias e das deficiências de ferro, é necessário que sejam investigadas todas as suas formas existentes, como: o ferro sérico, a transferrina e a ferritina. Sendo que, se apenas o ferro sérico for usado para determinar o estado geral do ferro em cães doentes, existe grande probabilidade de se ter uma falha nesse diagnóstico (SMITH, 1989; ANDREWS e SMITH, 2000).

No Brasil, já faz parte da rotina clínica a análise dos exames hematológicos como auxílio ao diagnóstico, avaliação pré-cirúrgica ou avaliação da saúde animal. No entanto, a verificação dos parâmetros do ferro são pouco utilizados e de pouco conhecimento por parte dos clínicos. As análises do ferro sérico e da capacidade ligadora do ferro são facilmente realizadas nos laboratórios especializados e precisam ser mais difundidas entre os clínicos veterinários, uma vez que trazem informações relevantes sobre o estado do ferro e sua correlação com estados anêmicos.

A utilização de índices relacionados à quantidade de reticulócitos, bem como a quantidade de hemoglobina dessas células, aparecem como alternativas promissoras para o diagnóstico precoce da deficiência de ferro, aliados aos parâmetros do ferro.

## REFERÊNCIAS

- ABBOUD, S.; e HAILE, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. **Journal of Biologic Chemistry**. v.275, p.19906 – 19912, 2000.
- AIRD, B. Clinical and Hematologic Manifestations of Anemia. In: FELDMAN B.F., ZINKE J.G., JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.140-142.
- ANDERSON, J.B. Minerais. In: Mahan LK, Escott-Stump S, Krause MV. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo:Roca; 2005. p.107-45.
- ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E.; GRA,Y.M., CHAVEY P.S. An improved ferritin assay for canine sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, p.57-60, 1992.
- ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E. Iron Metabolism. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.129-134.
- ANDREWS, N.C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. **Nature Review Genetics**, v.1, n.3: p.208-217, 2000.
- ANDREWS, N.C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice Research and Clinical Haematology**, v. 18, p. 159-169, 2005.
- BACILA, M. Ferro. In:\_\_\_\_\_ **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Robe Editorial,2003, p.370-372.
- BARRIOS,M.F.; DELGADO, N.F.; RAMÍREZ, P.H. Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. **Revista Cubana de Hamatología, Inmunología y Hemoterapia**, v.21, n.3, 2005.
- BEAUMONT, C. Molecular mechanisms of iron homeostasis. **Médecine Science**, Paris, v. 20, p. 68-72, 2004.
- BHANDARI, S.; NORKOLK, D.; BROWNJOHN, A.; TURNEY, J. Evaluation of RBC ferritin and reticulocyte measurements in monitoring response to intravenous iron therapy. **American Journal of Kidney Disease**. v. 30, p. 814-821, 1997.
- CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; CALI, A.; DE GOBBI, M.; GAROZZO, G.; CORELLA, M.; et al. The gene TfR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. **National Genetics**. v. 25, p.14 -5, 2000.
- CAR, B.D. Erythropoiesis and Erythrokinetics. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 105-109.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, p.85–99, 2005.

CHAUSOW, D.G.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L. Estimation of the Dietary iron Requirement for the Weanling Puppy and Kitten. **The Journal of Nutrition**, v.117, p.928-932, 1987.

CHRISTIAN, J.A. Red Blood Survival and Destruction. In: FELDMAN, B.F, ZINKE, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 117-124.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. Iron absorption and transport. **American Journal of Medical Science**, v. 318, p. 213-229, 1999.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Iron absorption and transport. **American Journal of Hematology**. v. 64, p. 287- 296, 2000.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Pathways of Iron Absorption. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 29, n.3, p.336-355, nov./dez. 2002.

COOK, J.D.; SKIKNE, B.S.; LINCH, S.R. Serum Ferritin in the Avaluation of Anemia. In: ALBERTIN, A. ed. **Radioimmunoassay of Hormones, Proteins and Enzymes**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980, p.239-248.

COUTO, C. G. Hematologia e Imunologia. Anemia In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p.1119-1132.

CUBAS, Z. S. **Siderose Hepática em Tucanos e Araçaris**. 158 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

DARAIO, F.; RYAN, E.; GLEESON, F.; CROWE, J.; CAMASCHELLA, C. Juvenil hemochromatosis due to G320V/Q116V compound heterozygosity of hemojuvelin in an Irish patient. **Blood Cells Molecular Disease** v.35, p.174-6, 2005.

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A., et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature** v.403, p.776–781, 2000.

ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative Haematology International**. v.5, p. 93–97, 1995.

EISENSTEIN, R.S.; BLEMININGS, K.P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. **Journal of Nutrition**. v.128, n.12, p.2295- 2298, 1998.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária . Doenças do Cão e do Gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FAIRBANKS, V.F.; FAHLEY, J.L.; BEUTLER, E. **Clinical Disorders of Iron Metabolism**. 2 ed. Nova York: Grunne and Stratton Inc. 1971.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A. et al. A novel MHC class I like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature of Genetics**. v. 3, p.399-408, 1996.

FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINK, I.A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.; WATSON, N. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. **Proc National Academy of Science of USA**. v.95, p.1472 -1477, 1998.

FEELDERS, R.A.; KUIPER-KRAMER, E.P.A.; VAN EIJK, H.G. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. **Clinical, Chemistry and Laboratory Medicine**, v.37, p.1-10, 1999.

FINCH, C.A.; COOK J.D. **American Journal of Clinical Nutrition** v.39, p. 471, 1984.

FLEMING, M.D.; ROMANO, M.A.; SU, M.A. et al. Nramp 2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp 2 in endosomal iron transport. **Proc National Academy of Science of USA**. v.95, p.1148 -53, 1998.

FLEMING, R.E.; SLY, W.S. Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis loss of function, gain in understanding. **Journal of Clinical Investigation**. v. 108, p.521 -522, 2001.

FREEMAN, K.P. Bone Marrow Avaliation. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 29-32.

FRY M.M., LIGGETT J.L., BAEK S.J. Molecular cloning and expression of canine hepcidin. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 33, p. 223–227, 2004.

FRY, M.M., KIRK, C.A. Reticulocyte índices in a canine model of nutritional iron deficiency. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, p.172 –181, 2006.

GABAY, C., KUSHNER I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal Medicine**, v. 340, p. 448–454, 1999.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**. v.103, p.783-788, 2003.

GANZ, T. Hepcidin – A Regulator of Intestinal Iron Absorption and Iron Recycling by Macrophages. **Best Practice of Research Clinical Haematology**, v. 18, p. 171-182, 2005.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2ed, São Paulo: Varela, 2005.

GOSWAMI, T.; ROLFS, A.; HEDIGER, M.A. Iron transport: emerging roles in health and disease. **Biochemistry of Cellular Biologic**, v. 80, p. 679-689, 2002.

HALLBERG, L. Perspectives on nutritional iron deficiency. **Annals Review of Nutrition**. v. 21, p.1–21, 2001.

HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1275, p. 161-203, 1996.

HARVEY, J.M. Myeloproliferative disorders in dogs and cats. **Veterinary Clinical of North America of Small Animal Practice**. v. 11, p. 349-381, 1981.

HARVEY, J. W.; FRENCH, T. W.; MEYER, D. J. Chronic iron deficiency anemia in dogs. **Journal of American Animal Hospital Association**. v.18, p. 946-960, 1982.

HARVEY, J.W. The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders. In: KANEKO, J.J; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5 ed. San Diego, California, Estados Unidos: Academic Press, 1997, p. 157 – 203.

HARVEY, J. W. Microcytic Anemias. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 200-204.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing Acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.117, p.285-297, 2004.

HO, C.H. The differential diagnostic values of serum transferrin receptor, serum ferritin and related parameters in the patients with various causes of anemia. **Haematologica**, Pavia. v.86, n.2, feb. p.206-207, 2001.

JAIN N.C. Blood Loss or Hemorrhagic Anemias In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 580-585.

JANDL J.H. **Blood: pathophysiology**. Oxford: Blackwell Scietific, 1991.

KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 3 ed. Nova York, Estados Unidos: Academic Press, 1980.

KNOLL, J.S. ClinicalAutomated Hematology Systems. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.3-11.

KRAUSE , M.V.; MAHAN, L.K. Cuidado nutricional em anemias. In: Krause MV, Mahan LK. **Alimentos nutrição e dietoterapia**. 7.ed .São Paulo: Roca, 1991. p.581-858.

LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 1-87, 2001.

LISTE, F.; GASCÓN, M.; PALACIO, J. Metabolismo del hierro en el perro: aplicaciones diagnósticas de la determinación del estatus férrico y valores de referencia en la raza Beagle. **Annals of Veterinary**. Murcia v. 9-10, p. 75-81, 1994.

LIU, X.; THEIL, E.C. Ferritin as an iron concentrator and chelator target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York. v. 1054, p.136-140, 2005.

MCKIE, A.T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A. et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. **Molecular Cell**, v.5, p.299–309, 2000.

MCKIE, A.T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G.O. et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science** v.291, p.1755–1759, 2001.

MONTEIRO, S.C.M.; MOREIRA, W.H.; SOUZA, A.P. Metabolismo do Ferro. **Ciência e Cultura**, Barretos, v.1, n.1, p. 11-18, 2006.

NICOLAS G, CHAUVET C, VIATTE L, DANAN JL, BIGARD X, DEVAUX I, BEAUMONT C, KAHN A, VAULONT S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.1037–1044, 2002

NIEDERKOFER, V.; SALIE, R.; ARBER, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.8, p.2180-2186, 2005.

ORINO K, MIURA T, MUTO S, WATANABE K. Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. **DNA Sequency** v.16, p. 58–64, 2005.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology Appl. Pharmacol.**, v.15, p. 199-211, 2005.

PÉREZ, G.; VITTORI, D.; PREGI, N.B.; GARBOSSA, G.; NESSE A. Homeostasis Del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.39, n.3, p.301-314, 2005.

PHILLIPS, J.D.; BING, G.; YU, Y.; BROWN, F.M.; LEIBOLD, E.A. Expression and biochemical characterization of Iron Regulatory Proteins 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v.35, n.4, p.15704-15714, 1996.

RAPOPORT, S.M. **The Reticulocyte**. Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRC Press, 1986.

RODRÍGUEZ MARTÍNEZ A, NIEMELA O, PARKKILA S. Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin . **Haematologica**. v.89, p.1441-1445, 2004.

ROETTO, A.; DARAIO, F.; ALBERTI, F. et al. Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2. **Blood Cell and Molecular Disease**. v.29, p.465 -470, 2002.

ROY, C.N.; ANDREWS, N.C. Recent advances in disorders of iron metabolism: Mutations, mechanisms and modifiers. **Human Molecular Genetics**. v.10, p.2181-2186, 2001

SEMENZA, G.L. Regulation of erythropoietin production: new insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. **Hematology, Oncology Clinics of North America**. v.8, p. 863-884, 1994.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.223-239.

SOYANO A., GOMEZ M. Role of iron in immunity and its relation with infections. **Archives of Latinoamerican Nutrition**, v. 49, p.40–46, 1999.

STEINBERG J.D., OLIVER C.S. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 34, p.23–27, 2005.

SRAI, S.K.S.; BOMFORD, A.; MCARDLE, H.J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. **Best Practice Research of Clinical Haematology**, v. 15, p. 243-259, 2002.

STEINBERG, J. D.; OLIVER, C. S. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 34, p.23–27, 2005.

SUNDER-PLOSSMANN G., PATRUTA S.I., HORL W.H. Pathobiology of the role of iron in infection. **American Journal of Kidney Disease** v. 34, p.25–29, 1999.

TAHER, A.; EL RASSI, F.; ISMAEEL, H.; KOUSSA, S.; INATI, A. CAPPELLINI, M.D. Correlation of liver iron concentration determined by R2 magnetic resonance imaging with serum ferritin in patients with thalassemia intermedia. **Haematologica**. Pavia. v.93, n.10, oct, p.1584-1586, 2008.

TESTA U. Recent developments in the understanding of iron metabolism. **Hematology Journal**, v. 3,p. 63-89, 2002.

THEIL, E.C. Ferritin: structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and microorganisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 289-315, 1987.

THEIL, E.C. IREs: a family of mRNA non-coding sequences. **Biochemistry Journal**. v.304, p.1-11, 1994.



THEURL, I.; FRITSCH, G.; LUDWICZEK, S.; GARIMORTH, K.; ELLMANTRINDER, D.; FOX, C.; VAUTIER, G.; OLYNYK, J.K. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut**; 51; p.290-295, 2002.

TORTI, F.M.; TORTI, S.V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, v. 99, p.3505-3516, 2002.

TRAUGH, J.A. Heme regulation of hematopoiesis. **Seminary of Hematology**. v. 26, p.54-62, 1989.

UMBELINO, D.C.; ROSSI, E.A. Deficiência de ferro: consequências biológicas e propostas de prevenção. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 27, n.2, p.103-112, 2006.

VACHA, J. In: AGAR, S.H.; BOARD, P.G. **Red Blood Cells of Domestic Mammals**. New York: Elsevier. 1983, p.67-132.

VULPE, C.D.; KUO, Y.M.; MURPHY, T.L.; COWLEY, L.; ASKWITH, C.; LIBIANA, N. et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. **Nature Genetics**. v. 21, p.195-199, 1999.

WANER, T., HARRUS, S. Anemia of Inflammatory Disease. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 205-209.

WATANABE, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO S. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. **BioMetals**, Holanda, v.13, p.57-63, 2000a.

WATANABE, K., MURANISHI, N.; MURATA, Y.; ORINO, K.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S. Biochemical properties of canine serum ferritin: iron content and nonbinding to concavalin A. **BioMetals**, v. 13, p. 319-324, 2000b.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; PHILLIPS, R.M. Enzyme linked immunosorbent assay for canine serum ferritin using monoclonal anti-canine ferritin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p.1193-1195, 1988.

WEST, A.P.; BENNETT, M.J.; SELLERS, V.M.; ANDREWS, N.C.; ENNS, C.A.; BJORKMAN, P.J. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. **Journal of Biological Chemistry** . v. 275, p.38135-8, 2000.

WHITESIDE, D.P. **Evaluation of the oral iron chelator deferiprone in the white leghorn chicken and domestic pigeon**. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Guelph, Canadá. Universidade de Guelph, Ontário, Canadá. National Library of Canadá. 2001. 235p Disponível em:  
< <http://www.collectionscanada.ca/obj/s4/f2/dsk3/ftp05/NQ61990.pdf>> Acessado em: 14 out. 2007.

WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. Erythrocyte Disorders. In: \_\_\_\_\_. **Small Animal Clinical Diagnosis** – by Laboratory Methods. 4ed. Estados Unidos: Saunders, 2004, p. 38-62.

### **3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS DA REGIÃO DE CURITIBA**

#### **RESUMO**

O ferro é fundamental para o metabolismo dos seres vivos, pois é essencial para a eritropoese, transporte de oxigênio e síntese de DNA. A determinação dos parâmetros do metabolismo do ferro associada aos resultados hematológicos constituem uma ferramenta importante para o diagnóstico, controle e diferenciação de estados anêmicos. O presente trabalho objetivou determinar os parâmetros do ferro (ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação do ferro, transferrina e ferritina) em cães sadios na cidade de Curitiba e microregião. Foram selecionados 120 cães, divididos em quatro grupos de sexo e faixa etária distintos (30 machos jovens e 30 adultos, 30 fêmeas jovens e 30 adultas). As amostras de sangue foram coletadas das 8 às 11h da manhã, com os cães em jejum e as análises processadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR. Os valores médios para o ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação do ferro e transferrina foram 138,2 µl/dl; 371 µl/dl; 232,6 µl/dl; 37,7% e 259,6 mg/dL respectivamente. Estes índices foram avaliados quanto às variações entre sexo e idade. Os valores médios foram submetidos ao teste de Tukey e não apresentaram variação significativa ( $P < 0,01$ ). Não houve variação significativa quanto às diferentes raças ( $P < 0,05$ ). Considerando a variação ao nível de 5% de probabilidade de erro, o ferro sérico apresentou-se mais elevado em cães machos adultos, comparados aos machos jovens. ( $P < 0,05$ ). A análise da ferritina apresentou leitura de 0 ng/mL nos kits de imunoenensaio quimioluminescente para humanos.

Palavras-chave: Parâmetros do ferro. Cães sadios. Ferro sérico. CTLF. Transferrina

### **3 IRON PARAMETERS DETERMINATION IN HEALTHY AND ANEMIC DOGS IN CURITIBA CITY AND SUBURBS**

#### **ABSTRACT**

Iron is vital for the life metabolism, due it is essential to the erythropoiesis, the oxygen transport and the DNA synthesis. The determination of iron metabolism rates associated with hematological findings is an important tool to diagnosis, control and differentiation of anemic states. This study has as objective to determine the iron parameters (serum iron, unsaturated iron binding-capacity, total iron binding-capacity, transferrin saturation rate (IST), transferrin and ferritin) in healthy dogs from Curitiba city and suburbs. It was selected 120 dogs, shared in four different groups of sex and age (30 young males and 30 adult males, 30 young females and 30 adult females). The blood samples were collected between 8 and 11h AM, with fasted dogs and the analysis was done in the Veterinary Clinic Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of Federal University of Paraná State. The average values to serum iron, unsaturated iron binding-capacity, total ironbinding-capacity, transferring percent saturation and transferrin are 138.2  $\mu\text{l/dl}$ ; 371  $\mu\text{l/dl}$ ; 232.6  $\mu\text{l/dl}$ ; 37.7% e 259.6 mg/dL respectively. These rates were evaluated according to sex and age variation. The average values were submitted to Tukey test and they did not present significant ( $P<0,01$ ). There was not significant variation according to different races ( $P<0,05$ ). Considering a 5% level variation of error probability, the serum iron was higher in adult male dogs, comparing with young male ones ( $P<0,05$ ). The ferritin values were 0 ng/mL in human chemiluminescent immunoassay kit.

Key words: Iron status; Healthy Dogs. Serum iron. TIBC. Transferrin

### 3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS DA MICROREGIÃO DE CURITIBA

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento químico muito abundante na natureza e de fundamental importância para os processos metabólicos dos animais (SMITH, 1997; MONTEIRO et al., 2006). Ele tem participação obrigatória e indispensável no processo hematológico. Além de ser fundamental à síntese de hemoglobina, faz parte das moléculas de mioglobina, citocromos e enzimas hemáticas, peroxidase e catalase (ANDREWS E SMITH, 2000).

O ferro encontra-se amplamente distribuído no organismo. Nos cães, como nos demais mamíferos, existem três compartimentos principais de distribuição do ferro. O maior compartimento é denominado operacional, correspondendo a 69% do conteúdo corpóreo total de ferro, e constituído principalmente por compostos de função metabólica e enzimática como a hemoglobina (55%), a mioglobina (4%) e enzimas heme (citocromos, catalase e peroxidase) e não heme (10%). O outro compartimento, o de reserva, corresponde a 30% do ferro corpóreo total, representado pela ferritina (16%) e hemossiderina (14%). Estes compartimentos estão ligados a um compartimento de transporte (1%), onde o ferro está ligado à transferrina plasmática ou ligado a receptores das membranas celulares (FIGURA 1) (SRAI et al., 2002; ANDREWS, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

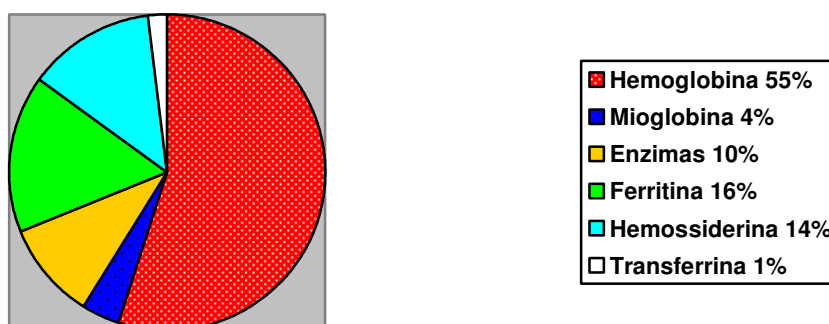


FIGURA 1 – PRINCIPAIS COMPARTIMENTOS DE DISTRIBUIÇÃO DO FERRO NO ORGANISMO

Considerando que o excesso e a deficiência de ferro podem ser extremamente deletérios ao organismo, os níveis deste elemento devem ser controlados. Para isto o organismo dispõe de mecanismos distintos e complexos nas

células, nos tecidos e no sistema orgânico (HENTZE et al., 2004). A quantidade de ferro presente no organismo é regulada principalmente pela absorção duodenal do ferro ingerido conforme as necessidades orgânicas (CONRAD; UMBREIT, 2000). Desta forma, existe um equilíbrio entre as quantidades absorvidas e as quantidades excretadas. Sua exigência orgânica nos animais domésticos varia em função da idade, da taxa de crescimento e da disponibilidade das fontes dietéticas do elemento. De acordo com Chausow e Czarnecki-Maulden (1987), os cães necessitam de no mínimo 80mg de ferro disponível/Kg de alimento (17,0mg ferro/1000 kcal ME).

Para a avaliação do metabolismo do ferro, é necessário quantificar as variáveis orgânicas relacionadas a ele, que são o hemograma (eritrograma e leucograma), as dosagens do ferro sérico, a transferrina e a ferritina. Estes valores podem sofrer alterações por um consumo inadequado de ferro na dieta ou pela ação de diversos processos patológicos (ALMEIDA et al, 2007).

O hemograma fornece informações referentes ao eritrograma, onde é avaliada a massa eritróide circulante, expressa quantitativamente em número de eritrócitos e concentração da hemoglobina. A insuficiência funcional do eritron ou anemia é definida como a diminuição da hemoglobina sangüínea, que acompanha a diminuição do número de eritrócitos (FAILACE, 2003).

A concentração do ferro sérico indica o ferro que está sendo transportado no plasma ligado à transferrina. Esta concentração apresenta-se diminuída nas anemias por deficiência de ferro (LEWIS et al., 2005).

A dosagem do ferro sérico tem sido obtida por métodos colorimétricos baseados na separação do ferro da transferrina, reduzindo-o ao estado ferroso e ligando-o a um cromóforo para a sua quantificação medida pela intensidade de cor desenvolvida (SYNERMED, 2003). Tais métodos são acessíveis, mas requerem grande quantidade de soro. A determinação do ferro sérico também pode ser obtida por espectrofotometria de absorção atômica, esta técnica requer muito tempo para a análise e possui o inconveniente de medir todo o ferro do soro, não distinguindo, em casos de hemólise, o ferro hemico do ferro ligado à transferrina e ferritina. Pode-se utilizar ainda, o método columétrico baseado na determinação do número de elétrons desprendidos pela passagem de uma corrente elétrica pela amostra, provocando uma transição entre os estados de oxidação dos átomos do ferro. É o método mais rápido e preciso, no entanto, o de maior custo (SMITH 1989).

A transferrina é considerada a proteína de transporte do ferro. Ela normalmente é expressa pela capacidade de ligação com o ferro, indicada pela capacidade latente de ligação (CLLF) somada ao ferro sérico, resultando na capacidade total de ligação do ferro (CTLF). Como o ferro sérico, pode ser determinada por métodos colorimétricos ou columétricos (SMITH, 1989). Apresenta-se aumentada nas anemias por deficiência de ferro e diminuída nas anemias por doença crônica (JAIN, 2000; WALLACH; KANAAN, 2003; LEWIS et al., 2005).

A ferritina sérica reflete os estoques corpóreos totais de ferro, uma vez que é a principal proteína de reserva deste metal no organismo. À medida que a deficiência de ferro progride ocorre diminuição dos níveis de ferritina sérica, seguida por anisocitose, microcitose, hipocromia, diminuição da hemoglobina, diminuição no ferro sérico, diminuição da saturação e aumento da transferrina (WALLACH e KANAAN, 2003). As técnicas para a determinação da ferritina sérica são reações dirigidas por anticorpos, como Radioimunoensaio, ELISA, Imunoturbidimetria e Quimioluminescência, de alta sensibilidade. No Brasil, a análise da ferritina humana tem sido realizada através de métodos quimioluminescentes, comercializados por diversos fabricantes. Os Kits de ELISA para a dosagem de ferritina sérica em cães já foram desenvolvidos nos Estados Unidos (WEEKS et al. 1988; ANDREWS et al. 1992) e no Japão (WATANABE et al. 2000), no entanto, não são comercializados. O Laboratório de Hematologia da Escola de Veterinária da Universidade do Kansas recebe amostras de soro para a análise da ferritina, porém, os elevados custos para o envio e processamento da amostra tornam inviável a realização da análise. O Laboratório de Bioquímica da Escola de Veterinária da Universidade de Kitasato, no Japão não recebe amostras biológicas de outros países.

A avaliação dos parâmetros do ferro associada aos resultados hematológicos é de grande auxílio para o diagnóstico diferencial das anemias, tais como a anemia ferropriva, a anemia dos processos inflamatórios e a anemia hemolítica (LISTE et al., 1994; JAIN, 2000).

No Brasil, a análise dos exames hematológicos como auxílio ao diagnóstico, avaliação pré-cirúrgica ou avaliação do bem estar animal já fazem parte da rotina clínica. No entanto, a verificação dos parâmetros do ferro é pouco utilizada e necessita ser mais difundida entre os clínicos veterinários.

Existe a carência de valores do metabolismo do ferro específicos para a população de cães no Brasil. Atualmente são utilizados parâmetros do ferro

estabelecidos nos Estados Unidos (FELDMAN et al., 1981; HARVEY et al., 1982; WEEKS et al. 1989) que indicam valores gerais para a espécie, não havendo separação entre sexo e idade.

Os objetivos do presente trabalho foram determinar os valores do ferro sérico, capacidade de ligação do ferro e ferritina sérica de 120 cães saudáveis, machos e fêmeas, adultos e jovens da região de Curitiba.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 1)

#### 3.2.1 Seleção dos Animais

Foram utilizados 120 cães subdivididos em quatro grupos: 30 fêmeas jovens; 30 fêmeas adultas; 30 machos jovens e 30 machos adultos. Os cães eram procedentes de dois Canis do Exército Brasileiro de Curitiba (20º Batalhão de Infantaria Blindada e 5ª Companhia da Polícia do Exército); do Canil da Polícia Militar do Paraná; do canil do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná e de dois canis de criadores particulares da região de Curitiba, Canil Borda do Campo e Canil Torre Forte. Os animais eram submetidos a um manejo sanitário adequado, com vacinações anuais e desverminações a cada quatro meses.

Foram utilizados cães das raças Beagle, Pastor Alemão, Rottweiler e Retriever do Labrador. Para a categoria dos cães jovens foram utilizados animais entre três e 12 meses de idade e para os cães adultos, animais de 13 meses a oito anos de idade.

Os animais foram selecionados segundo os seguintes parâmetros de inclusão: anamnese e exame clínico; exames hematológicos e bioquímicos e exames coproparasitológicos.

Na anamnese e exame clínico completo observou-se os seguintes aspectos: ausência de qualquer processo inflamatório nos três meses anteriores, coloração normal de mucosa oral e conjuntival, ausência de qualquer evidência de lesão



dermatológica, ausência de sinais de lesão no sistema locomotor, linfonodos normais à palpação, ausculta pulmonar e cardíaca normais, ausência de parasitas externos, alimentação balanceada com os níveis de exigência para cada categoria. Nas fêmeas a ausência de cio, gestação e lactação nas fêmeas.

Durante a anamnese e exame físico foram preenchidas as fichas de identificação para cada animal, em fichas específicas para machos e fêmeas (APÊNDICES 1 e 2)

Nos animais selecionados, foram realizados os exames hematológicos, análises bioquímicas (urinálise e enzimas hepáticas) e análise coproparasitológica. Os animais que apresentaram alguma alteração nos exames laboratoriais ou presença de parasitas intestinais foram descartados.

### 3.2.2 Coleta das amostras

Foi realizada uma coleta de sangue por animal, no período da manhã, entre às 8:00 e 11:00 horas. Os cães estavam em jejum por mais de 8 horas.

Os animais foram imobilizados por contenção física e o sangue foi coletado mediante a punção da veia cefálica ou da veia jugular.

O sangue foi imediatamente acondicionado em dois tubos distintos, um com o anticoagulante etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) para a realização do hemograma e o outro sem o anticoagulante para a obtenção do soro. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração após a coleta, durante o transporte até o momento das análises laboratoriais.

Os esfregaços sangüíneos foram realizados imediatamente após a coleta de sangue e acondicionados para posterior coloração no laboratório.

Foram coletadas amostras de fezes de cada animal para a análise coproparasitológica, acondicionadas separadamente, identificadas e mantidas sob refrigeração até o momento do exame.

### 3.2.3 Análises laboratoriais

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária e as coproparasitológicas no Laboratório de

Parasitologia, ambos do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Os cães que apresentaram alterações nos parâmetros avaliados foram descartados.

### 3.2.3.1 Hemograma

O hemograma envolveu os seguintes parâmetros:

- a) contagem total de eritrócitos e de leucócitos: realizada no contador automático de células sangüíneas CELM CC530 (CELM, Barueri, São Paulo);
- b) determinação da concentração de hemoglobina: obtida no contador automático CELM CC530;
- c) determinação do Volume Globular (micro-hematócrito): realizado pela técnica do micro-hematócrito (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Realizou-se a centrifugação a 19000 rpm durante 5 minutos em uma micro-centrífuga (Luguimac) e feita a leitura no cartão de micro-hematócrito;
- d) determinação do volume globular médio (VGM) e da concentração de hemoglobina média (CHGM);
- e) coloração do esfregaço: os esfregaços de sangue foram corados com a técnica de Romanowski (Panótico Rápido LB, Laborclin, Pinhais, Paraná);
- f) contagem diferencial de leucócitos e avaliação morfológica dos eritrócitos e leucócitos por observação do esfregaço em microscópio ótico binocular com objetiva de imersão (100x).

### 3.2.3.2 Proteína plasmática total e fibrinogênio

Os valores da proteína plasmática total foram obtidos no refratômetro, após a centrifugação do sangue a 19000 rpm durante 5 minutos em micro-centrífuga.

A determinação da concentração do fibrinogênio foi obtida pelo método clássico de precipitação pelo calor (KANEKO e SMITH, 1967). A amostra de sangue foi incubada a 56°C, por 3 minutos e centrifugada a 19000 rotações por minuto durante 5 minutos em micro-centrífuga. A leitura foi realizada no refratômetro e o valor obtido foi subtraído do valor da proteína total.

### 3.2.3.3 Análises bioquímicas

Após a centrifugação da amostra sangüínea sem anticoagulante, foi separado o soro e realizadas as provas bioquímicas: a) uréia, pelo método enzimático GLDH; b) enzima alanina-transaminase (ALT ou TGP – transaminaseglutamico pirúvica), pelo método cinético e c) creatinina, pelo método cinético do Picrato alcalino. As análises foram feitas pelo analisador semi-automático CELM SBA 200 (CELM, Barueri, São Paulo).

### 3.2.3.4 Exame coproparasitológico

Foi coletada uma amostra de fezes por animal, no mesmo dia da coleta de sangue. As amostras foram analisadas pela técnica de flutuação Willis-Molay e as lâminas observadas em microscopia ótica para a pesquisa de ovos de helmintos e oocistos de protozoários.

### 3.2.3.5 Ferro sérico

As análises do ferro sérico foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. As amostras foram analisadas até seis dias após a coleta, permanecendo refrigeradas entre 2 e 8°C durante este período e acondicionados em frascos plásticos.

O ferro sérico foi determinado pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (FERROZINE), com kits próprio (In Vitro, Diagnóstica S/A, Itabira, Minas Gerais). Foram utilizados 250µl de soro de cada amostra e as leituras feitas em espectrofotômetro (METROLAB® 330), na faixa de 565nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos eram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro.

Na análise do ferro sérico, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e na presença de ácido tioglicólico é reduzido a  $Fe^{+2}$ . O íon reduzido liga-se ao reagente de cor (ferrozine), formando um complexo molecular de coloração rósea, cuja intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra (FIGURA 2).

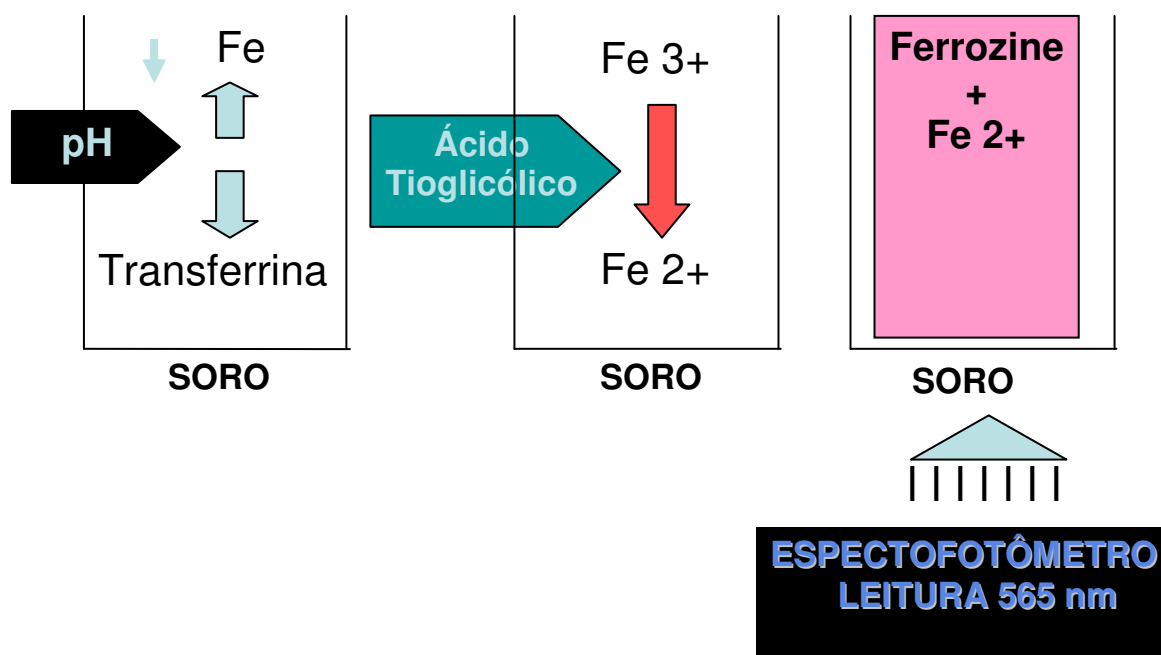


FIGURA 2 – MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DO FERRO SÉRICO

O valor do ferro sérico foi determinado pela fórmula:

$$\text{Fe } (\mu\text{l/dl}) = (A2 - A1) \times \text{FC}$$

A2 = Absorbância da amostra na segunda leitura

A1 = Absorbância da amostra na primeira leitura

FC = Fator de Calibração (100 divididos pela absorbância do padrão)

### 3.2.3.6 Capacidade Ligadora do ferro

As análises da capacidade ligadora do ferro foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. As amostras foram analisadas até seis dias após a coleta, permanecendo refrigeradas entre 2 e 8°C durante este período e acondicionados em frascos plásticos.

A capacidade ligadora do ferro foi determinada pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (FERROZINE), com kits próprio (In Vitro, Diagnóstica S/A, Itabira, Minas Gerais). Foram utilizados 250µl de soro de cada amostra e as leituras feitas em espectrofotômetro (METROLAB® 330), na faixa de 560nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos eram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro.

Para a determinação da capacidade ligadora do ferro, a amostra é incubada com uma solução padrão de ferro (500 µg/dl) em meio tamponado (pH 8,3). Ocorre a

saturação dos sítios disponíveis para o ferro na transferrina. Feita a adição do reagente de cor (ferrozine) o excesso de ferro não ligado forma um complexo magenta determinando a capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) conforme a Figura 3.

A capacidade ligadora do ferro foi determinada para a obtenção dos valores da capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) e da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) obtidas pelos seguintes cálculos:

$$\text{CLLF } (\mu\text{g/dl}) = 500 - \{ (A2 - A1 / AP) \times 500 \}$$

$$\text{CTLF } (\text{mg/dl}) = \text{CLLF} + \text{Ferro sérico}$$

A capacidade latente de ligação do ferro indica a quantidade de ferro que a transferrina ainda pode ligar.

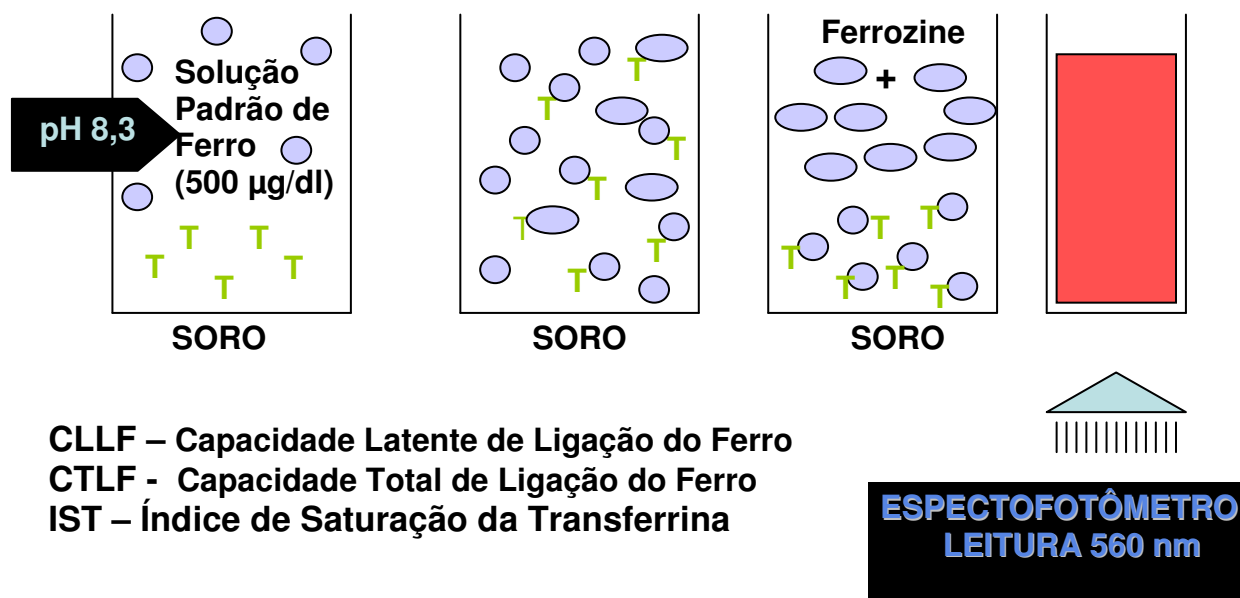


FIGURA 3 – MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE LIGADORA DO FERRO

### 3.2.3.7 Transferrina

A determinação do valor da Transferrina foi obtido pela fórmula:

$$\text{TRF } (\text{mg/dl}) = \text{CTLF} \times 0,7$$

### 3.2.3.8 Índice de Saturação da Transferrina

Obteve-se também o índice de saturação da transferrina pela fórmula:

$$\text{IST (\%)} = (\text{Ferro s\acute{e}rico} / \text{CTLF}) \times 100$$

### 3.2.3.9 Ferritina

Devido \u00e0 inexist\u00eancia de kit para dosagem de ferritina canina, realizou-se um teste piloto com Kits para seres humanos. Os soros dos c\u00e3es foram analisados pelos m\u00e9todos de Imunoensaio Quimioluminescente de Microp\u00e1rticulas (CMIA), ARCHITECT Ferritina\u2122, para an\u00e1lise quantitativa de ferritina de seres humanos, da ABBOTT Laborat\u00f3rios do Brasil Ltda. As an\u00e1lises foram processadas em equipamento autom\u00e1tico do Sistema ARCHITECT, no Laborat\u00f3rio de Imunologia do Hospital de Cl\u00ednicas da UFPR.

As amostras tamb\u00e9m foram processadas pelo M\u00e9todo Enzima Imunoensaio Quimioluminescente para aparelho automatizado IMMULITE-1000 Systems (Diagnostic Products Corporation, USA), para an\u00e1lise quantitativa de ferritina humana, no Laborat\u00f3rio Balagu\u00e9, localizado em Sorocaba, S\u00e3o Paulo.

### 3.2.4 An\u00e1lise estat\u00edstica

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com arranjo bifatorial (2x2) considerando o fator sexo (macho ou f\u00eamea) e o fator idade (jovens ou adultos). Foram usadas 28 repeti\u00e7\u00f5es por tratamento. Os dados foram submetidos \u00e0 an\u00e1lise de vari\u00e2ncia ao n\u00edvel de 1 e 5% de probabilidade de erro. As m\u00e9dias foram comparadas com o teste de Tukey. A amplitude da varia\u00e7\u00e3o das m\u00e9dias foi estimada pelo intervalo de confian\u00e7a e pelo desvio padr\u00e3o. Os dados foram processados com aux\u00edlio do programa computacional GENES (CRUZ, 2006).

## 3.3 RESULTADOS

Foram estabelecidos os valores m\u00e9dios dos par\u00e2metros do ferro por categoria de sexo e idade (Tabela 4).

A vari\u00e1vel ferro n\u00e3o apresentou diferen\u00e7as significativas para o fator sexo ( $P < 0,05$ ). Por\u00e9m, as m\u00e9dias do fator idade, jovens e adultos, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Os valores dos adultos foram superiores aos dos jovens, contudo, uma m\u00e9dia geral para jovens (f\u00eameas e machos) pode ser adotada e uma

para adultos (fêmeas e machos). Não houve interação entre os fatores sexo e idade para o ferro (Tabela 4).

TABELA 4: VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS DO FERRO DE CÃES, POR CATEGORIA DE SEXO E IDADE.

	Machos		Fêmeas	
FERRO (µg/dL)	Média	IC*	Média	IC
Jovens	112,6bA <sup>†</sup>	93,7-131,5	149,4bA	123,6-175,1
Adultos	136,6aA	120,2-152,9	154,3aA	134-174,6
CV(%)		38,4		
CTLF (µg/dL)				
Jovens	381,8aA	352,1 - 411,5	365,7aA	343,4 – 387,9
Adultos	356,1aA	326,4 – 385,8	380,6aA	345,3 – 415,8
CV(%)		20,9		
IST %				
Jovens	29,3aA	24,8 – 33,8	40,8aA	34,2 – 47,3
Adultos	39,3aA	34,8 – 43,8	41,4aA	36,6 – 46,1
CV(%)		31,2		
TRANSFERRINA (mg/dL)				
Jovens	266,9aA	246,1 – 287,7	256aA	240,4 – 271,6
Adultos	249,3aA	228,5 – 270,1	266,4aA	241,7 – 291,1
CV(%)		20,9		
CLLF (µg/dL)				
Jovens	268,3 aA	243,5 – 293	216,3 aB	187,4 – 245,2
Adultos	219,5 bA	194,7 – 244,2	226,3 aA	195,3 – 257,3
CV(%)		31,2		

<sup>†</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro ( $P < 0,05$ ); \* IC – Intervalo de Confiança (95%); CV – Coeficiente de variação; CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação da Transferrina

A análise estatística das variáveis, capacidade total de ligação do ferro (CTLF), transferrina e porcentagem de saturação da transferrina (IST %) não apresentou diferença significativa para os fatores sexo e idade nem houve interação entre os fatores,  $P < 0,05$  (Tabela 4).

Os valores da CLLF não apresentaram diferenças significativas para os fatores sexo e idade, no entanto, apresentaram interação entre os fatores ( $P < 0,05$ ). Os valores entre os animais adultos (machos e fêmeas) não apresentaram variação significativa. No entanto, entre os jovens houve variação entre o sexo, sendo o valor dos machos superior ao das fêmeas ( $P < 0,05$ ). Entre as fêmeas, não houve variação significativa entre jovens e adultas. Entretanto, entre os machos, a variação foi significativa ( $P < 0,05$ ), sendo que a média dos jovens foi superior à dos adultos (Tabela 4).

Ao nível de probabilidade de 1% de erro, não houve variação significativa na análise dos parâmetros do ferro em nenhum dos fatores (idade e sexo) e nem interação entre os mesmos ( $P < 0,01$ ), (Tabela 5).

TABELA 5- VALORES MÉDIOS GERAIS DOS PARÂMETROS DO FERRO DE CÃES

	<b>Obtidos *</b>	<b>Harvey **</b>	<b>Weeks ***</b>
	<b>n = 120</b>	<b>n = 35</b>	<b>n = 95</b>
<b>Parâmetro</b>	<b>Média <sup>1</sup> ± DP</b>	<b>Média (amplitude)</b>	<b>Média** ± DP</b>
<b>Ferro (µg/dL)</b>	138,2 ± 18,6	149 (84-233)	86,4± 30,8
<b>CTLF (µg/dL)</b>	371,0 ± 12,4	391 (284-572)	321,8± 43,5
<b>CLLF (µg/dL)</b>	232,6 ± 24,2	243 (142-393)	-
<b>IST %</b>	37,7 ± 5,7	39,3 (19,6-59,3)	-
<b>Transferrina (mg/dL)</b>	259,6 ± 8,5	-	-

<sup>1</sup> Médias gerais obtidas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade de erro ( $P < 0,01$ ). \* Cães adultos, jovens, fêmeas e machos de Curitiba; \*\* HARVEY et al., 1982; \*\*\* WEEKS et al., 1989; DP – Desvio Padrão; CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação da Transferrina

Nas análises da ferritina foram obtidos valores inferiores a 1,0 ng/mL para todas as amostras, nas duas técnicas realizadas.

### 3.4 DISCUSSÃO

A determinação do metabolismo do ferro é composta por três parâmetros séricos: o ferro, a transferrina (CLLF e CTLF) e a ferritina. Os valores de referência dos parâmetros do ferro para a espécie canina foram na maioria obtidos para cães nos Estados Unidos, sendo escassos os valores no Brasil (GUIMARÃES, 1998; MUNDIN, 2008).

Os valores de ferro encontrados no presente trabalho foram obtidos pelo método colorimétrico e foram cerca de 1,6 vezes maior do que os obtidos com o método colométrico utilizado para cães (WEEKS et al, 1989). Esta variação possivelmente é devido à diferença dos métodos. Conforme Smith (1989), o método colométrico não apresenta interferência de outros compostos do soro, como lipídios e colesterol, o que poderia explicar esta variação encontrada. Harvey et al. (1982) obtiveram valores próximos (149 µg/dL) também pelo método colorimétrico.



Liste et al. (1994) apresentaram um valor de ferro sérico superior (181,7ng/dL), com a utilização de um método colorimétrico (batofenantrolina), entretanto utilizaram uma amostra de oito cães.

Nos cães desse estudo não houve diferença significativa relativa ao sexo, como também observado por outros autores (LISTE et al., 1994; COELHO et al., 2006; MUNDIN, 2008). Em estudo com seres humanos foi evidenciada a diferença entre os sexos, com valores mais elevados para os homens (jovens e adultos) (YIP et al., 1984)

Este estudo observou valores de ferro significativamente mais baixos para os cães jovens ( $P < 0,05$ ), conforme o relatado por MUNDIN (2008). Fato que pode ser explicado pela elevada demanda pelo organismo na fase de crescimento (SMITH, 1989).

Nesse estudo, as coletas de sangue foram realizadas das 8:00 às 11:00 horas da manhã. Existem divergências quanto aos horários das coletas de sangue para determinação de ferro, porque os níveis de ferro sérico oscilam devido a uma variação circadiana, que resulta da variação na liberação do ferro do sistema reticuloendotelial para o plasma, conforme os níveis de cortisol sérico (COOK et al. 1992; WORWOOD, 1997). No entanto, Dale et al. (2002) não observaram um padrão consistente de variação entre os diferentes horários do dia (8 h da manhã, meio dia e 4 h da tarde), indicando que não há necessidade de se restringir a coleta de material a um horário específico do dia.

O valor de referência da CTLF, citado por WEEKS et al. (1989), foi obtido pelo método colométrico, sendo inferior ao valor encontrado neste estudo. Fato que pode ser explicado pela mesma condição de interferência no método colorimétrico como descrito para o ferro sérico. HARVEY et al. (1982), também pelo método colorimétrico, relataram valores da CLLF e do índice de saturação do ferro, 243 µg/dL 39,3% respectivamente, para 35 cães saudáveis, divididos igualmente entre machos e fêmeas, no entanto não foi especificada a faixa etária dos animais.

Não foi observada variação significativa quanto às raças para o ferro sérico, estando em conformidade com os resultados apresentados por Mert et al. (2008), nem para as demais variáveis.

Os testes de recuperação por meio das análises de ferritina com os Kits humanos foram realizados, porém, os resultados foram inferiores a 1 ng/mL, revelando a incapacidade de leitura das amostras caninas, mostrando a

especificidade de antígenos para o teste destinado para seres humanos. Em estudo utilizando-se kit específico para ferritina canina, foram encontrados valores normais de 62ng/mL (WEEKS et al., 1989) e de 298 ng/mL (WATANABE et al., 2000). Apesar da alta homologia entre os aminoácidos das cadeias de ferritina humana e canina, H = 96% e L = 86% (ORINO et al., 2005), supõe-se que a porção de ferritina humana purificada, utilizada nos kits para seres humanos, possui uma sequência de aminoácidos não homóloga à ferritina canina. Sendo assim, os valores da ferritina canina não foram considerados nesse estudo.

### 3.5 CONCLUSÃO

O ferro sérico e a capacidade ligadora do ferro podem ser analisados como rotina nos laboratórios de patologia clínica veterinária.

Não há variação dos parâmetros do ferro entre as raças Beagle, Pastor Alemão, Rotweiler e Retriever do Labrador.

Podem ser adotados para cães, os valores de ferro sérico, CLLF, CTLF, IST e Transferrina encontrados nesse estudo.

A determinação da ferritina canina pelos métodos de quimioluminescência humana não fornecem uma leitura confiável.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.F. LOPES, E. L.; NUNES, R.C. et al. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1097-1103, jul-ago, 2007.
- ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E.; GRA, Y.M., CHAVEY P.S. An improved ferritin assay for canine sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, p.57-60, 1992.
- ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E. Iron Metabolism. In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.129-134.
- ANDREWS, N.C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice Research and Clinical Haematology**, v. 18, p. 159-169, 2005.
- CHAUSOW, D.G.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L. Estimation of the Dietary iron Requirement for the Weanling Puppy and Kitten. **The Journal of Nutrition**, v.117, p.928-932, 1987.
- COELHO, A.O.; MUNDIM, A.V.; HORTÊNCIO, S.M.; GUIMARÃES, E.C.; ESPINDOLA, F.S. Influência dos Fatores Etários e Sexuais nos Valores de Ferro Sérico e Seus Metabólitos em Cães da Raça Doberman. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 101, set. 2006.
- CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Iron absorption and transport. **American Journal of Hematology**. v. 64, p. 287- 296, 2000.
- COOK, J.M.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Review** v.5, p. 189-202, 1992.
- CRUZ, C. D. Programa **GENES: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV, 2006. 285p.
- DALE, J.C.; BURRITT, M.F.; ZINSMEISTER, A.R. Diurnal Variation of Serum Iron, Iron-Binding Capacity, Transferrin Saturation, and ferritin Levels. **American Journal of Clinical Pathology**. v.117, p.802-808, 2002.
- FAILACE, R. **Hemograma: manual e interpretação**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 297p.
- FELDMAN, B.F.; KANEKO, J.J.; FARVER, T.B. Anemia of Inflammatory Disease in the Dog: Ferrokinesics of Adjuvant-Induced Anemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n.4, p.583-585, april, 1981.
- HARVEY, J.W.; FRENCH, T.W.; MEYER, D.J. Chronic Iron Deficiency Anemia in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. Gainesville, v.18, nov/dec, p.946-960, 1982.

HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing Acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.117, p.285-297, 2004.

JAIN N.C. Blood Loss or Hemorrhagic Anemias In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 580-585.

KANEKO, J.J.; SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **California Veterinarian**, Sacramento, v.21, n.4, p.21-24, 1967.

LEWIS, S. M. et al. I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 572p.

LISTE, F.; GASCÓN, M.; PALACIO, J. Metabolismo del hierro en perro Metabolismo Del Hierro En El Perro: Aplicaciones Diagnósticas de la Determinación del Estatus Férrico y Valores de Referencia en la Raza Beagle. **Annals of Veterinary**, Murcia. v 9, n.10, p. 75-81, 1994.

MONTEIRO, S.C.M.; MOREIRA, W.H.; SOUZA, A.P. Metabolismo do Ferro. **Ciência e Cultura**, Barretos, v.1, n.1, p. 11-18, 2006.

MERT, H.; MERT, N.; DOGAN, I.; CELLAT, M.; YASAR, S. Element Status in Different Breeds of Dogs. **Biological Trace Elements Research**. v. 125, p. 154-159, 2008.

MUNDIM, A. V **Perfil Bioquímico Sérico em Potros Bretão Postier e Cães Doberman em Fase de Crescimento e de Cabras Saanen nos Diferentes Estádios de Lactação**. 76f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

ORINO, K.; MIURA, T.; MUTO, S.; WATANABE, K. Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. **DNA Sequency**. v.16, p.58-64, 2005.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.223-239.

SRAI, S.K.S.; BOMFORD, A.; MCARDLE, H.J. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. **Best Practice Research of Clinical Haematology**, v. 15, p. 243-259, 2002.

SYNERMED. Ferro Sérico 600. Synermed International Inc. Westfield, IN, USA. 2003.

WALLACH, J.; KANAAN, S. **Interpretação de exames laboratoriais**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

WATANABE, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO S. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. **BioMetals**, Holanda, v.13, p.57-63, 2000.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; PHILLIPS, R.M. Enzyme linked immunosorbent assay for canine serum ferritin using monoclonal anti-canine ferritin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p.1193-1195, 1988.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; NORTHROP, J.K. Relationship of serum ferritin and iron concentrations and serum total iron-binding capacity to nonheme iron stores in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, feb, p. 198-200, 1999.

WORWOOD M. Iron-deficiency anaemia and iron overload. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I, eds. **Practical Haematology**, 9 ed, London: Churchill Livingstone; 2001, p.115-128.

YIP, R.;JOHNSON, C.; DAILMAN, P.R.Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency<sup>1</sup>2. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, march, p. 427-436, 1984.

## **4 PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES ANÊMICOS DE CURITIBA**

### **RESUMO**

As anemias decorrentes de diversas origens e classificações são encontradas freqüentemente na prática da clínica médica de cães. Segundo os registros do serviço do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, em 2008, as anemias estão presentes em 15,9% de todos os hemogramas realizados em cães em um ano, correspondendo a 87,8% de cães adultos e 12,2% de cães jovens. O presente estudo teve por objetivos verificar os valores do ferro sérico, da capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), da capacidade total de ligação do ferro (CTLF), do índice de saturação da transferrina (IST), da transferrina e da ferritina de cães anêmicos, comparar aos valores de cães saudáveis, identificar suas variações nas diferentes classificações de anemias e correlacionar a contagem do número de policromatófilos com o índice de reticulócitos. Foram avaliadas 42 amostras de sangue, de 29 cães anêmicos provenientes da rotina clínica do Hospital Veterinário da UFPR e do Hospital Veterinário São Bernardo de Curitiba. Realizou-se a contagem de reticulócitos dos animais, em lâminas preparadas com o azul de cresil, para obter os índices de reticulócitos (IR). As anemias foram classificadas conforme o IR em regenerativas ( $IR > 1$ ) e não regenerativas ( $IR < 1$ ), segundo os índices hematimétricos e pela presença ou não de inflamação. Foram determinados os parâmetros do ferro (ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação da transferrina e transferrina) e comparados os resultados entre as diferentes classificações das anemias. Não houve variação significativa dos valores que permitisse a diferenciação dos tipos de anemia. O ferro sérico não apresentou redução nas anemias microcíticas. As anemias inflamatórias apresentaram valores normais dos parâmetros do ferro. Houve correlação positiva significativa entre o índice de reticulócitos e a contagem de policromatófilos nas anemias regenerativas ( $IR > 1$ ). A análise da ferritina apresentou leitura de 0 ng/mL nos kits de imunoensaio quimioluminescente para humanos.

Palavras-chave: Anemia. Parâmetros do ferro. Ferro sérico. Transferrina. Saturação do ferro. Cães.

#### 4. IRON PARAMETERS IN ANEMIC DOGS FROM CURITIBA

##### ABSTRACT

Anemia from different causes and classifications are largely seen in dog clinics. Anemia was presented in 15.9% from all dogs hemograms performed during 2008 at the Clinic Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of Federal University of Paraná State, 87.8% corresponded to adults and 12.2% to young dogs. The objectives of this study were to determine serum iron, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), total iron binding-capacity (TIBC), percent saturation of transferrin (IST), transferrin and ferritin from anemic dogs; compare these values to the healthy dogs; identify their change in different anemia classifications and correlate the polychromatophiles count with the reticulocyte index. Were evaluated 42 blood samples, from 29 anemic dogs coming from the Veterinary Hospital of UFPR and São Bernardo Veterinary Hospital. The reticulocytes counting were performed in smears in a Cresil blue dye, to get the reticulocyte index (RI). The anemias were classified in regenerative (RI>1) and nonregenerative anemias (RI<1), according to the hematimetrics index and by the presence or absence of inflammation. Iron parameters were established and the results were compared between different anemia classifications. The results had no significant difference to identify different types of anemia. Serum iron value didn't decreased in microcytic anemia. Inflammatory anemia presented normal values for iron parameters. Reticulocyte index and polychromatophiles counting were correlated significantly in regenerative anemias (RI>1). The ferritin values were 0 ng/mL in human chemiluminescent immunoassay kit.

Key word: Anemia. Iron status. Serum iron. Transferrin. Iron saturation. Anemic dogs.

## 4 PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES ANÊMICOS DE CURITIBA

### 4.1 INTRODUÇÃO

A anemia é uma manifestação clínica decorrente de diversos processos patológicos, caracterizada pela diminuição na massa de eritrócitos, do hematócrito (HT) e da concentração de hemoglobina (Hb) abaixo dos valores de referência. As manifestações clínicas das anemias são determinadas em parte pela sua origem específica e pela sua patogênese, no entanto, todos os sinais clínicos devem-se à capacidade reduzida de transporte de oxigênio pelo sangue (AIRD, 2000; JAIN, 2000). A anemia aparece como um dos primeiros sinais de várias doenças, sendo fundamental encontrar a sua causa específica, não apenas o seu diagnóstico.

Segundo os registros do serviço do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, as anemias estão presentes em 15,9% de todos os hemogramas realizados em cães, em 2008, correspondendo a 87,8% de cães adultos e 12,2% de jovens. Considerando-se que a anemia é freqüente na clínica médica de cães, o estudo do metabolismo do ferro é necessário como auxílio ao seu diagnóstico e tratamento. A determinação dos parâmetros do ferro (ferro sérico, capacidade de ligação do ferro, transferrina e ferritina) complementam as análises hematológicas e bioquímicas para o diagnóstico diferencial das anemias, tais como a anemia ferropriva, a anemia dos processos inflamatórios e a anemia hemolítica (LISTE et al., 1994; JAIN, 2000). Estas análises são realizadas rotineiramente para a avaliação na medicina humana, no entanto, na medicina veterinária elas ainda são pouco utilizadas.

A mensuração do ferro sérico permite acessar o compartimento de transporte do ferro. Ela é feita pela utilização de provas colorimétricas, onde ocorre a redução do pH, reduzindo  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  fazendo sua separação da transferrina (SMITH, 1989).

A transferrina é mensurada em termos do conteúdo de ferro ligado, depois de ter sido saturada com este metal. Após esta saturação o conteúdo de ferro da transferrina é expresso como a capacidade ligadora do ferro (CLF). A CLF somada ao ferro sérico revela a CTLF (capacidade total de ligação do ferro). Como a transferrina pode ligar mais moléculas de ferro do que normalmente existem ligadas, a CTLF é maior do que o ferro sérico. A diferença entre eles é a capacidade latente



de ligação do ferro (CLLF). A CTLF pode ser traduzida como a transferrina livre, disponível para ser ligada ao ferro. Pode ser obtido também, o índice de saturação da transferrina (IST). Este índice é a razão do ferro sérico pela CTLF, multiplicado por 100 (HENRY et al., 1974)

As anemias podem ser classificadas baseadas nos índices hematimétricos em três categorias principais: normocítica normocrômica, macrocítica hipocrômica e microcítica hipocrômica (WILLARD; TVEDTEN, 2004). Outra forma de classificação está relacionada à resposta da medula óssea e à contagem de reticulócitos, dividindo-as em regenerativas (com resposta medular) e não regenerativas (pouca ou nenhuma resposta medular) (TYLER; COWEL, 1996; FERNANDEZ; GRINDEN, 2000). Os resultados laboratoriais de uma regeneração podem ser evidentes, no entanto, deve ser considerada a severidade da anemia, sua duração, o tratamento instituído e as diversas origens (TVEDTEN; WEISS, 2000).

Os índices de reticulócitos são de grande importância para o diagnóstico e monitoramento da deficiência de ferro em cães, uma vez que suas alterações são mais pronunciadas do que as variações hematológicas e bioquímicas convencionais, além de serem mais precocemente detectados em alguns casos (FRY e KIRK, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo verificar os valores do ferro sérico, da capacidade ligadora do ferro, da transferrina e da ferritina de cães anêmicos; comparar aos valores de cães saudáveis; identificar suas variações nas diferentes classificações de anemias e correlacionar a contagem do número de policromatófilos com o índice de reticulócitos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 1).

#### 4.2.1 Seleção dos Animais e Coletas das Amostras

Foram analisadas 42 amostras de sangue de 29 cães anêmicos provenientes da rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e do Hospital Veterinário São Bernardo de Curitiba.

Os cães foram examinados pelos médicos veterinários e as amostras de sangue foram coletadas durante a consulta. O sangue foi imediatamente acondicionado em dois tubos distintos, um com o anticoagulante etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) para a realização do hemograma e o outro sem o anticoagulante para a obtenção do soro. As amostras foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná para a realização das análises.

Foram considerados anêmicos os cães adultos com hematócrito inferior a 37% e os jovens com hematócrito inferior a 41,6%.

#### 4.2.2 Análises laboratoriais

##### 4.2.2.1 Hemograma

O hemograma envolveu os seguintes parâmetros:

- a) contagem total de eritrócitos e de leucócitos: realizada no contador automático de células sangüíneas CELM CC530 (CELM, Barueri, São Paulo);
- b) determinação da concentração de hemoglobina: obtida no contador automático CELM CC530;
- c) determinação do Volume Globular (micro-hematócrito): realizado pela técnica do micro-hematócrito (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Realizou-se a centrifugação a 19000 rpm durante 5 minutos em uma micro-centrífuga (Luguimac) e feita a leitura no cartão de micro-hematócrito;
- d) determinação do volume globular médio (VGM) e da concentração de hemoglobina média (CHGM);
- e) coloração do esfregaço: os esfregaços de sangue foram corados com a técnica de Romanowski (Panótico Rápido LB, Laborclin, Pinhais, Paraná);
- f) contagem diferencial de leucócitos, avaliação morfológica dos eritrócitos e leucócitos;

g) contagem do número de policromatófilos (10 campos) por observação do esfregaço em microscópio ótico binocular com objetiva de imersão (100x).

#### 4.2.2.2 Proteína plasmática total

Os valores da proteína plasmática total foram obtidas no refratômetro, após a centrifugação do sangue a 19000 rpm durante 5 minutos em micro-centrífuga.

#### 4.2.2.3 Contagem de reticulócitos

Preparou-se uma mistura de sangue total com o corante azul de cresil, na diluição 1:1, a qual permaneceu incubada por 20 minutos. Foram preparadas duas extensões laminares a partir da mistura. Depois de secas as lâminas foram coradas com a técnica de Wright.

Os reticulócitos foram contados paralelamente à contagem de 1000 eritrócitos em microscópio ótico binocular com objetiva de imersão (100x), indicando a porcentagem de reticulócitos relativa.

A contagem absoluta de reticulócitos foi obtida pela multiplicação do número percentual de reticulócitos pelo número total de eritrócitos.

Obteve-se a porcentagem de reticulócitos corrigida pelo cálculo:

$$\text{Ret \% corrigida} = (\text{HT paciente}/\text{média do HT médio normal}) \times \text{Ret \%}$$

Para a obtenção do índice de reticulócitos (IR), foi dividido o valor da porcentagem corrigida de reticulócitos pelo tempo esperado de maturação no sangue em dias.

#### 4.2.2.4 Análises bioquímicas

Após a centrifugação da amostra sangüínea sem anticoagulante, foi separado o soro e realizadas as provas bioquímicas: a) uréia, pelo método enzimático GLDH; b) enzima alanina-transaminase (ALT ou TGP – transaminaseglutamico pirúvica), pelo método cinético e c) creatinina, pelo método cinético do Picrato alcalino. As análises foram feitas pelo analisador semi-automático CELM SBA 200 (CELM, Barueri, São Paulo).

#### 4.2.2.5 Ferro sérico

As análises do ferro sérico foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. As amostras foram analisadas até seis dias após a coleta, permanecendo refrigeradas entre 2 e 8°C durante este período e acondicionados em frascos plásticos.

O ferro sérico foi determinado pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (FERROZINE), com kits próprio (In Vitro, Diagnóstica S/A, Itabira, Minas Gerais). Foram utilizados 250µl de soro de cada amostra e as leituras feitas em espectrofotômetro (METROLAB® 330), na faixa de 565nm. Os tubos utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos eram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro.

Na análise do ferro sérico, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e na presença de ácido tioglicólico é reduzido a  $Fe^{+2}$ . O íon reduzido liga-se ao reagente de cor (ferrozine), formando um complexo molecular de coloração rósea, cuja intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração de ferro na amostra.

O valor do ferro sérico foi determinado pela fórmula:

$$Fe (\mu l/dl) = (A2 - A1) \times FC$$

A2 = Absorbância da amostra na segunda leitura

A1 = Absorbância da amostra na primeira leitura

FC = Fator de Calibração (100 divididos pela absorbância do padrão)

#### 4.2.2.6 Capacidade Ligadora do ferro

As análises da capacidade ligadora do ferro foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. As amostras foram analisadas até seis dias após a coleta, permanecendo refrigeradas entre 2 e 8°C durante este período e acondicionados em frascos plásticos.

A capacidade ligadora do ferro foi determinada pelo método colorimétrico de Goodwin modificado (FERROZINE), com kits próprio (In Vitro, Diagnóstica S/A, Itabira, Minas Gerais). Foram utilizados 250µl de soro de cada amostra e as leituras feitas em espectrofotômetro (METROLAB® 330), na faixa de 560nm. Os tubos

utilizados na manipulação das amostras durante os procedimentos eram de plástico e descartáveis, para evitar a contaminação com traços de ferro.

Para a determinação da capacidade ligadora do ferro, a amostra é incubada com uma solução padrão de ferro (500 µg/dl) em meio tamponado (pH 8,3). Ocorre a saturação dos sítios disponíveis para o ferro na transferrina. Feita a adição do reagente de cor (ferrozine) o excesso de ferro não ligado forma um complexo magenta determinando a capacidade latente de ligação do ferro (CLLF).

A capacidade ligadora do ferro foi determinada para a obtenção dos valores da capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) e da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) obtidas pelos seguintes cálculos:

$$\text{CLLF } (\mu\text{g/dl}) = 500 - \{ (A2 - A1 / AP) \times 500 \}$$

$$\text{CTLF } (\text{mg/dl}) = \text{CLLF} + \text{Ferro sérico}$$

A capacidade latente de ligação do ferro indica a quantidade de ferro que a transferrina ainda pode ligar.

#### 4.2.2.7 Transferrina

A determinação do valor da Transferrina foi obtido pela fórmula:

$$\text{TRF } (\text{mg/dl}) = \text{CTLF} \times 0,7$$

#### 4.2.2.8 Índice de Saturação da Transferrina

Obteve-se também o índice de saturação da transferrina pela fórmula:

$$\text{IST } (\%) = (\text{Ferro sérico} / \text{CTLF}) \times 100$$

#### 4.2.2.9 Ferritina

Devido à inexistência de kit para dosagem de ferritina canina, as amostras foram submetidas à análise em Kit destinados para seres humanos. Os soros dos cães foram analisados pelos métodos de Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas (CMIA), ARCHITECT Ferritina®, para análise quantitativa de ferritina humana, da ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda. As análises foram processadas em equipamento automático do Sistema ARCHITECT, no Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

As amostras também foram processadas pelo Método Enzima Imunoensaio Quimioluminescente para aparelho automatizado IMMULITE-1000 Systems (Diagnostic Products Corporation, USA), para análise quantitativa de ferritina humana, no Laboratório Balagué, localizado em Sorocaba, São Paulo.

#### 4.2.3 Análise estatística

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com 15 animais por tratamento. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan. Foi considerado o nível de 5% de probabilidade de erro. O índice de reticulócitos e o número de policromatófilos foram analisados pelo teste de correlação. Os dados foram processados com auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2006).

#### 4.3 RESULTADOS

Com base na regeneração eritrocitária, as anemias foram classificadas conforme o índice de reticulócitos (IR), sendo  $IR > 1$ , as anemias regenerativas e  $IR < 1$ , não regenerativas. Foram comparados os parâmetros do ferro entre elas e o grupo de animais sadios. As variáveis ferro sérico, CTLF, IST e Transferrina não apresentaram variações significativas entre os valores médios dos anêmicos com  $IR < 1$ ,  $IR > 1$  e sadios ( $P < 0,05$ ). A variável CLLF teve seu valor médio significativamente menor para os anêmicos com  $IR > 1$ , enquanto os valores entre anêmicos com  $IR < 1$  e sadios não variaram significativamente,  $P < 0,05$  (Tabela 6).

TABELA 6: MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO NOS CÃES ANÊMICOS COM BASE NO ÍNDICE DE REGENERAÇÃO ( $< 1$  E  $> 1$ ) COMPARADAS ÀS MÉDIAS DOS CÃES SADIOS

<b>Classificação das anemias</b>	<b>Ferro (µg/dL)</b>	<b>CLLF (µg/dL)</b>	<b>CTLF (µg/dL)</b>	<b>IST%</b>	<b>Transferrina (mg/dL)</b>
<b>IR &gt; 1</b>	153,1 a <sup>†</sup>	146,4 b	299,5 a	46,6 a	209,6 a
<b>IR &lt; 1</b>	143,2 a	215,1 a	358,3 a	38,0 a	250,8 a
<b>SADIOS</b>	138,2 a	232,6 a	371,0 a	37,7 a	259,6 a
<b>CV(%)</b>	70,3	42,7	31,1	55,2	31,2

<sup>†</sup> Letras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação do Ferro; IR – Índice de Reticulócitos; CV – Coeficiente de Variação

Na análise de correlação entre os índices de reticulócitos e o número de policromatófilos, o coeficiente de correlação foi significativo para as anemias regenerativas ( $IR > 1$ ) e não significativo para as anemias não regenerativas,  $IR < 1$  (Figuras 4 e 5).

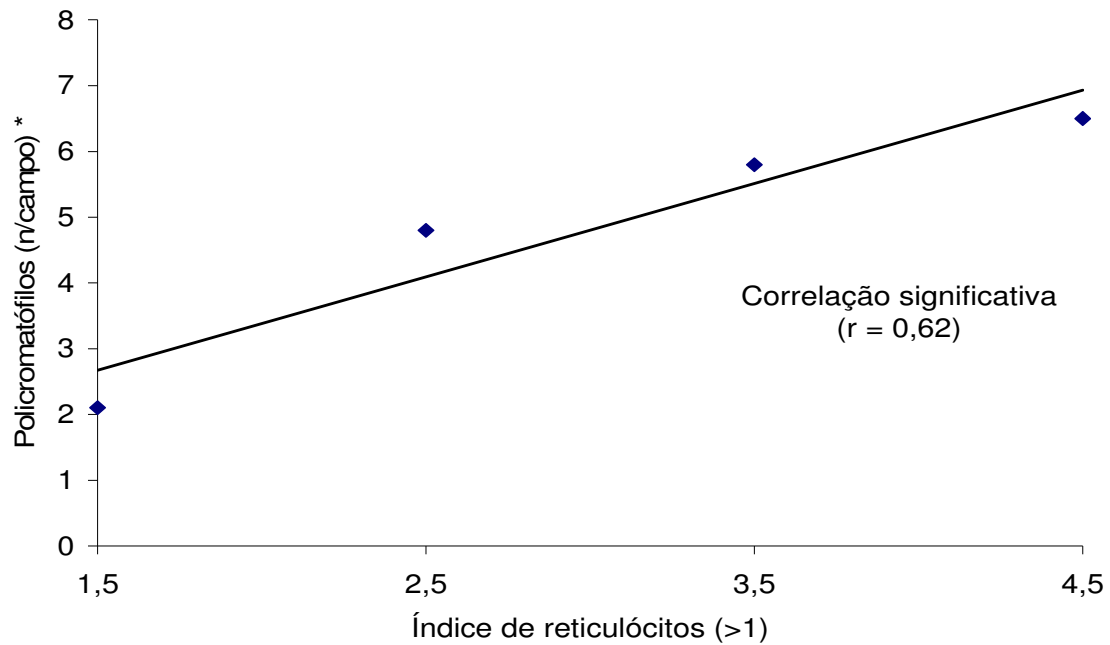


FIGURA 4. Correlação significativa entre a contagem de policromatófilos e o  $IR > 1$ .

\* média de policromatófilos em 10 campos;  $r$  = Coeficiente de correlação

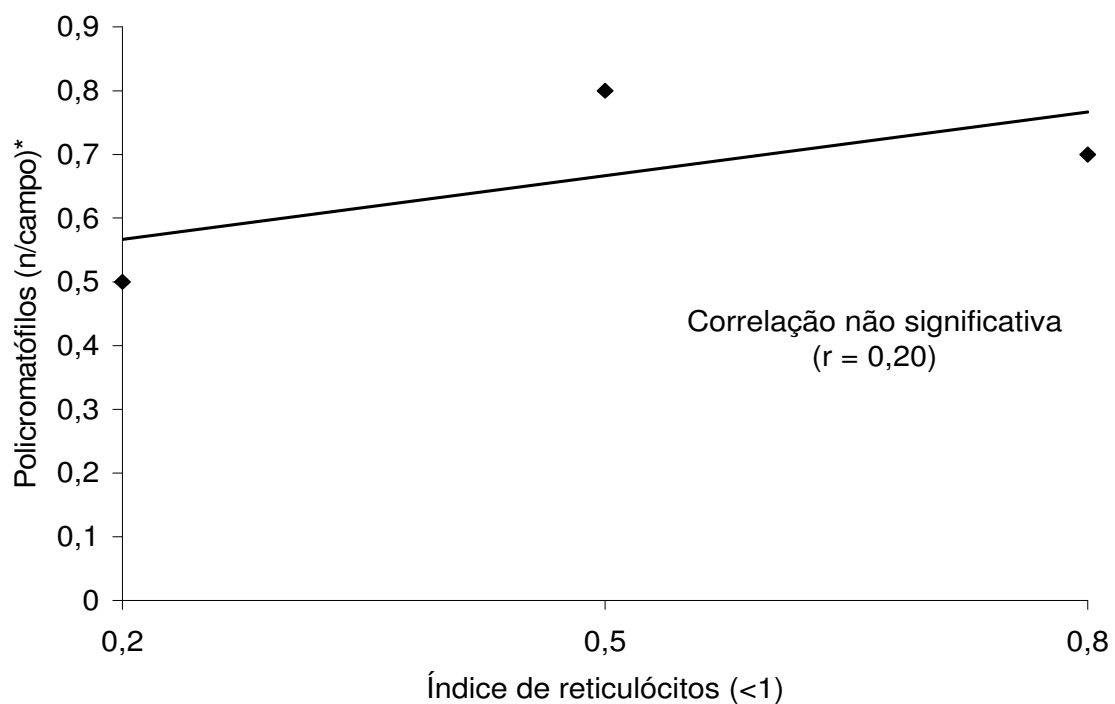


FIGURA 5. Correlação não significativa entre a contagem de policromatófilos e o  $IR < 1$ .

$r$  = Coeficiente de correlação; \* média de policromatófilos em 10 campos

Segundo a classificação pelos índices hematimétricos, os animais anêmicos foram divididos em dois grupos principais, com anemia macrocítica hipocrômica e normocítica normocrômica. Os valores médios do ferro sérico, CLLF, CTLF, IST e Transferrina não apresentaram variação significativa entre os grupos de anêmicos e entre os animais sadios ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7).

TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO NOS CÃES COM ANEMIA MACROCÍTICA HIPOCRÔMICA, NORMOCÍTICA NORMOCRÔMICA E CÃES SÁDIOS

<b>CLASSIFICAÇÃO DAS ANEMIAS</b>	<b>Ferro (µg/dL)</b>	<b>CLLF (µg/dL)</b>	<b>CTLF (µg/dL)</b>	<b>IST %</b>	<b>Transferrina (mg/dL)</b>
<b>Normocítica Normocrômica</b>	135,1 a	186,2 a	321,4 a	39,0 a	225,0 a
<b>Macrocítica Hipocrômica</b>	188,4 a	125,2 a	313,7 a	58,8 a	219,6 a
<b>Sádios</b>	138,2 a	232,6 a	371,0 a	37,7 a	259,6 a
<b>CV(%)</b>	63,1	41,7	27,5	54,3	27,5

<sup>†</sup> Letras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação do Ferro; CV – Coeficiente de Variação

O grupo da anemia normocítica normocrômica representou 53,4% do total de anemias analisadas.

Os cães apresentaram também outros três tipos de anemia conforme os índices hematimétricos: anemia macrocítica normocrômica, normocítica hipocrômica e microcítica normocrômica.

Os cães anêmicos com  $IR > 1,0$  e os cães com anemia macrocítica hipocrômica foram agrupados como portadores de anemia regenerativa e não apresentaram variação significativa entre nenhuma das variáveis do ferro,  $P < 0,05$ . Os cães do grupo das anemias não regenerativas, com  $IR < 1,0$  e com anemia normocítica normocrômica também não apresentaram variação significativa na comparação dos parâmetros do ferro (Tabela 8).

As anemias normocíticas normocrômicas representaram 73% das anemias com  $IR < 1$ .

No grupo formado pelas anemias com  $IR > 1$ , 26% eram macrocíticas hipocrômicas; 26% normocíticas hipocrômicas, 26% normocíticas normocrômicas e 21% macrocíticas normocrômicas.



TABELA 8 – COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS DO FERRO ENTRE OS GRUPOS DE ANEMIAS REGENERATIVAS E NÃO REGENERATIVAS

	<b>Ferro (µg/dL)</b>	<b>CLLF (µg/dL)</b>	<b>CTLF (µg/dL)</b>	<b>IST %</b>	<b>Transferrina (mg/dL)</b>
<b>Anemias Regenerativas</b>					
<b>IR &gt;1</b>	153,1 a <sup>1</sup>	146,4 a	299,5 a	46,6 a	209,6 a
<b>Macrocítica hipocr.</b>	188,4 a	125,2 a	313,7 a	58,8 a	219,6 a
<b>Média geral</b>	170,7	135,8	306,6	52,7	214,6
<b>CV(%)</b>	76,3	52,0	28,7	56,8	28,7
<b>Anemias Não Regenerativas</b>					
<b>IR &lt;1</b>	143,2 a <sup>1</sup>	215,1 a	358,3 a	38,0 a	225,0 a
<b>Normocítica normocr.</b>	135,1 a	186,2 a	321,4 a	39,0 a	219,6 a
<b>Média geral</b>	139,2	200,6	339,8	38,5	222,3
<b>CV(%)</b>	75,1	42,2	32,7	64,6	32,7

<sup>1</sup> Letras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

\* IR – Índice de Reticulócitos CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação do Ferro; CV – Coeficiente de Variação

O IR médio das anemias normocíticas normocrômicas foi de 1,0 e o das macrocíticas hipocrômicas foi de 3,0.

As anemias macrocíticas normocrômicas e as normocíticas hipocrômicas apresentaram um IR médio de 2,5 e 2,7 respectivamente, enquanto as microcíticas normocrômicas apresentaram IR médio de 0,4.

Foram comparados os parâmetros do ferro entre os cães com anemia sem resposta inflamatória e cães com anemia com resposta inflamatória aguda (leucograma com leucocitose, neutrofilia com desvio nuclear à esquerda) e o grupo de cães saudáveis. Do total de cães anêmicos avaliados, 30,2% apresentavam indicativos de resposta inflamatória aguda. As médias dos índices de ferro sérico, CTLF e Transferrina não apresentaram variação significativa entre os grupos,  $P < 0,05$  (Tabela 9). O valor médio de CLLF das anemias com inflamação foi significativamente menor que os grupos ( $P < 0,05$ ). O IST apresentou variação significativamente maior nas anemias com inflamação.

Do total de cães anêmicos avaliados, 27,6% apresentavam insuficiência renal, com valores médios de creatinina de 2,5 mg/dL e Uréia de 137 mg/dL. Os valores médios de ferro sérico, CLLF, CTLF, IST e Transferrina para estes animais foram de 111,8 µg/dL, 143,8 µg/dL, 255,6 µg/dL, 42,3% e 178,9 mg/dL, respectivamente.

TABELA 9 – MÉDIAS DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SADIOS, ANÊMICOS NA AUSÊNCIA DE INFLAMAÇÃO E ANÊMICOS NA PRESENÇA DE INFLAMAÇÃO AGUDA.

Grupos de cães	Ferro (µg/dL)	CLLF (µg/dL)	CTLF (µg/dL)	IST %	Transferrina (mg/dL)
Com inflamação aguda	188,1 a <sup>1</sup>	126,5 b	314,7 a	57,4 a	220,3 a
Sem inflamação	142,9 a	192,3 a	335,2 a	40,0 b	234,6 a
Sadios	138,2 a	232,6 a	371,0 a	37,7 b	259,6 a
CV(%)	67,3	40,5	30,3	46,0	30,3

<sup>1</sup> Letras seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

CLLF – Capacidade Latente de Ligação do Ferro; CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro; IST – Índice de Saturação do Ferro; IR – Índice de Reticulócitos; CV – Coeficiente de Variação

Os cães com hepatopatia (valores médios de ALT = 157,5UI/L) representaram 19% do total de cães anêmicos e apresentaram os seguintes valores médios dos parâmetros do ferro: ferro sérico = 167,3 µg/dL; CLLF = 161,5 µg/dL; CTLF = 328,8 µg/dL; IST = 44,6% e Transferrina = 230,1 mg/dL.

Nas análises da ferritina foram obtidos valores de 0 ng/mL para todas as amostras, nas duas técnicas realizadas.

#### 4.4 DISCUSSÃO

As anemias de diversas causas são comuns nos cães. Em 2008 a prevalência de cães anêmicos foi de 15,9%, nos hemogramas realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. Harvey et al. (1982) relataram uma prevalência de 38% de anemia nas análises hematológicas de cães, em um ano, na Universidade da Flórida, Estados Unidos.

O diagnóstico laboratorial da anemia é fundamental para a sua confirmação e classificação, com o objetivo de identificar a sua causa. Além das análises hematológicas feitas na rotina clínica (hemograma, leucograma, análises bioquímicas, contagem de reticulócitos), as análises dos parâmetros do ferro são de grande auxílio na classificação e no tratamento das anemias.

A contagem de reticulócitos é essencial na investigação da atividade eritrocitária e deve ser realizada quando o hematócrito for inferior a 30% nos cães (WILLARD; TVEDTEN, 2004). O valor do índice de reticulócitos (IR) foi adotado neste estudo por indicar o grau de regeneração conforme a severidade da anemia (valor do hematócrito) correlacionada ao tempo de maturação esperado do reticulócito no sangue. Assim, ele reflete o valor mais confiável de regeneração

eritrocitária, importante para o diagnóstico, classificação e monitoramento do tratamento das anemias (JOÃO et al., 2008).

Nesse estudo não foram observadas diferenças nos valores de ferro sérico, CTLF, IST e Transferrina, entre os grupos de cães sadios, com anemias regenerativas e não regenerativas. Os valores de ferro, CTLF, CLLF, IST e Transferrina estabelecidos de acordo com o tipo de anemia classificadas pelos índices de reticulócitos ( $IR > 1$  e  $IR < 1$ ) não foram encontrados na literatura.

A correlação entre o IR e o número de policromatófilos foi significativa para as anemias regenerativas e não significativa para as anemias não regenerativas. Uma das características das anemias regenerativas é a liberação de reticulócitos pela medula, proporcional à gravidade da anemia (TVEDTEN; WEISS, 2000)

As anemias classificadas em normocíticas normocrômicas neste estudo não apresentaram diminuição significativa no ferro sérico, quando comparado com o grupo de cães sadios. Nas anemias normocíticas normocrômicas os valores do ferro e da CTLF apresentaram-se reduzidos (STONE e FREDEN, 1990; JURADO, 1997; WANER e HARRUS, 2000; WILLARD e TVEDTEN, 2004). Segundo Feldman et al. (1981) e Guimarães (1998) em experimento com a indução de anemia normocítica normocrômica pela administração de adjuvante de Freund em 12 e 6 cães respectivamente, foi observada a redução do ferro sérico e da CTLF.

Sugere-se a realização de estudo para o monitoramento dos pacientes e acompanhamento da evolução da anemia.

No presente estudo, foi confirmado pelo IR médio que as anemias macrocíticas hipocrômicas e macrocíticas normocrômicas são regenerativas, conforme observado com outros autores (TYLER; COWELL, 1996; TVEDTEN; WEISS, 2000). As anemias normocíticas hipocrômicas também apresentaram um índice maior do que um, caracterizando-se como regenerativas.

O grupo da anemia microcítica normocrômica teve IR médio de 0,4, classificada como não regenerativa. Nesse estudo não foi observado diminuição de ferro nas anemias microcíticas. Segundo Weiser e Kociba (1983) e Harvey (2000), o valor do Volume Globular Médio (VGM) sofre redução (microcitose) antes da concentração média de hemoglobina (CHGM) (hipocromia) nos animais com deficiência de ferro. Desta forma, sugere-se que a anemia microcítica normocrômica seja uma fase inicial da anemia microcítica hipocrômica. A causa mais freqüente da anemia microcítica em cães é a deficiência de ferro pela perda crônica de sangue

(HARVEY et al, 1982), podendo ser observada também em cães com anomalias porto-sistêmicas (LAFLAMME et al., 1994; SIMPSON et al., 1997). Embora o mecanismo exato responsável pela microcitose ainda não seja totalmente esclarecido, sugere-se que exista uma alteração no metabolismo do ferro (MEYER e HARVEY, 1994; BUNCH et al., 1995; SIMPSON et al., 1997).

O diagnóstico precoce de uma deficiência de ferro, antes do aparecimento dos sinais característicos (microcitose, hipocromia) ou na presença de neoplasias ou inflamações, é um desafio. Como o ferro é utilizado preferencialmente na síntese de hemoglobina, o organismo pode estar desenvolvendo uma eritropoese ferro-dependente, e as alterações hematológicas aparecerem apenas com o avanço da deficiência de ferro (WEEKS et al., 1989; STEINBERG e OLIVER, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Sugere-se um monitoramento dos valores nos animais anêmicos e a determinação da ferritina.

As anemias dos processos inflamatórios do presente estudo não apresentaram diferenças significativas quanto aos parâmetros do ferro, quando comparadas aos cães saudáveis. Estudos experimentais, com a indução da inflamação em cães, tiveram diminuição do ferro sérico, da CTLF e do IST, oito a 11 dias após a administração do adjuvante de Freund (FELDMAN et al., 1981). Guimarães (1998) também obteve valores reduzidos dos parâmetros, após a mesma forma de indução de anemia inflamatória. Neumann (2003) relatou a diminuição dos níveis de ferro sérico em cães e gatos com resposta inflamatória, mas não observou correlação entre os valores do ferro e os sinais de inflamação.

Nos processos inflamatórios, ocorre o aumento da síntese de citocinas, as quais promovem o aumento da liberação de lactoferrina (proteína ligadora de ferro). A ativação dos macrófagos durante a inflamação aumenta sua ligação à lactoferrina, que libera o ferro dentro dos macrófagos para a formação de ferritina (SMITH et al., 1985). A liberação de apolactoferrina pelos neutrófilos nos locais de infecção leva a uma ligação *in situ* com o ferro, diminuindo a sua disponibilidade para o crescimento bacteriano (LEE, 1983; WANER e HARRUS, 2000; NEMETH e GANZ, 2006).

A diminuição do ferro provavelmente poderia ser observada com o monitoramento do processo inflamatório.

A doença renal é sabidamente um fator importante no desencadeamento das anemias, principalmente pela diminuição da síntese de eritropoetina que acarretará

na eritropoese reduzida (WILLARD; TVEDTEN, 2004). Os cães com níveis anormais de uréia e creatinina apresentaram valores de ferro sérico inferiores à média dos cães saudáveis. Em humanos, foi relatada a diminuição do ferro sérico em pacientes com insuficiência renal crônica (TARALOV et al., 1998). As doenças renais podem ser associadas ao desenvolvimento de processos inflamatórios, o que poderia ser uma das causas da redução dos níveis de ferro.

Nos cães que apresentavam elevação nos níveis de ALT foi observado o aumento do ferro sérico e do IST comparados aos cães saudáveis. Estudos desenvolvidos na indução crônica de hepatopatia em cães (SOUBASIS et al., 2006) também demonstraram estas alterações. Em humanos, acometidos de hepatite crônica dos tipos B e C, foram detectados valores elevados destas variáveis (CASARIL, et al. 2000; FABRIS et al., 2001) sendo atribuído à lesão dos hepatócitos (DI BISCEGLIE et al., 1992; SOUBASIS et al., 2006).

Nesse estudo foi avaliado o ferro sérico, a CTLF, a CLLF, o IST e a transferrina. Na rotina clínica humana os parâmetros mais utilizados são o ferro sérico, a CTLF e o índice de saturação da transferrina (YAMANISHI et al., 2003). A capacidade total de ligação do ferro (CTLF) indica a quantidade máxima de ferro necessária para saturar a transferrina sérica (AISEN et al., 1966; YAMANISHI et al., 2003), e corresponde diretamente à concentração da transferrina (VERMET, 1993; GAMBINO et al., 1997). Apesar do IST ser indicada por ter forte correlação com a concentração do ferro na medula óssea (MORGAN, 1972; LINDER; MUNRO, 1977), e ser um indicativo preditivo da anemia ferropriva, segundo Cook (1982) possui uma precisão limitada, uma vez que depende das variações do ferro sérico e da CTLF.

Os Kits para a dosagem de ferritina canina foram desenvolvidos por ELISA, nos Estados Unidos (WEEKS et al. 1988; ANDREWS et al. 1992) e no Japão (WATANABE et al. 2000), no entanto não são comercializados. A análise da ferritina canina ainda é inviável no Brasil, devido à indisponibilidade de kit específico para a espécie e devido ao alto custo para envio de amostra ao exterior. Quando realizadas, as análises da ferritina devem ser analisadas em associação aos demais parâmetros do ferro, porque é uma proteína de fase aguda e pode resultar em níveis elevados sem corresponder ao aumento do ferro no organismo (WATANABE et al., 2000).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Os valores dos parâmetros do ferro estabelecidos neste estudo não permitiram a distinção das diferentes classificações de anemias.

Não houve variação significativa nos parâmetros do ferro entre as anemias regenerativas, não regenerativas e animais sadios.

Nas anemias com resposta inflamatória aguda os valores dos parâmetros do ferro não apresentaram alteração.

Pode-se utilizar a correlação do índice de reticulócitos com a contagem de policromatófilos nas anemias regenerativas ( $IR > 1$ ).

A determinação da ferritina canina pelos métodos de quimioluminescência humana não fornecem uma leitura confiável.

## REFERÊNCIAS

AIRD, B. Clinical and Hematologic Manifestations of Anemia. In: FELDMAN B.F., ZINKE J.G., JAIN N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.140-142.

AISEN, P.; LEIBMAN, A.; REICH, H.A. Studies on the binding of iron to transferrin and conalbumin. **Journal of Biology and Chem** v.241, p.1666–71, 1966.

ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E.; GRA, Y.M., CHAVEY P.S. An improved ferritin assay for canine sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, p.57-60, 1992.

BUNCH, S.E.; JORDAN, H.L.; SELLON, R.K., CULLEN, J.M., SMITH, J.E. Characterization of iron status in young dogs with portosystemic shunt. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 853–858, 1995.

CASARIL, M.; STANZIAL, A.M.; TOGNETTA, P. et al. Role of iron load on fibrogenesis in chronic hepatitis C. **Hepatogastroenterology**, v. 47, p. 220–5, 2000.

COOK, J.D. Clinical evaluation of iron deficiency. **Seminars of Hematology**. v. 19, p. 19, p.6-18, 1982.

CRUZ, C. D. Programa **GENES: estatística** experimental e matrizes. Viçosa: UFV, 2006. 285p.

DIBISCEGLIE AM, AXIOTIS CA, HOOFNAGLE JH, BACON BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology** 1992; 102: 2108–13.

FABRIS, C.; TONIUTTO, P.; SCOTT, C.A. et al. Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. **Clin. Chim. Acta** 2001; 304: 49–55.

FELDMAN, B.F.; KANEKO, J.J.; FARVER, T.B. Anemia of Inflammatory Disease in the Dog: Ferrokinesics of Adjuvant-Induced Anemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n.4, p.583-585, april, 1981.

FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 200-204.

FERNADEZ, F.R.; GRINDEM, C.B. Reticulocyte Response. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 110-116.

FRY, M.M., KIRK, C.A. Reticulocyte índices in a canine model of nutritional iron deficiency. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, p.172 –181, 2006.

GAMBINO, R.; DESVARIEUX, E.; ORTH, M. et al. The relationship between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically

measured transferrin concentrations in human serum. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 2408–12, 1997.

GUIMARÃES, J.E. **Avaliação da ferritina sérica e de outros parâmetros relativos ao metabolismo do ferro, na anemia do processo inflamatório de cães, induzido por Adjuvante de Freund**. 64f. Tese (Doutorado em Clínica veterinária) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HARVEY, J.W.; FRENCH, T.W.; MEYER, D.J. Chronic Iron Deficiency Anemia in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 12, nov/dec, p. 946-960, 1982.

HARVEY, J.W. Microcytic Anemias. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 200-204.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical Chemistry: Principles and Techniques**. 2 ed. New York: Harper & Row, 1974.

JAIN N.C. Blood Loss or Hemorrhagic Anemias In: FELDMAN BF, ZINKE JG, JAIN N C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 580-585.

JOÃO, A. R.; PINTO, S.; COSTA, E. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v.30, n.3, p.188-192, 2008.

JURADO, R.I. Iron, infections and anemia of inflammation. **Clinical Infections Disease**. v. 52, p.888-895, 1997.

LAFLAMME, D.P.; MAHAFFEY, E.A.; ALLEN, S.W. et al. Microcytosis and iron status in dogs with surgically induced portosystemic shunts. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, p. 212–216, 1994.

LEE, G.R. The anemia of chronic disease. **Seminar of Hematology**, v. 20, p. 61-79, 1983.

LINDER, M.C.; MUNRO, H.N. The mechanism of iron absorption and its regulation. **Fed. Proc** v.36, p. 2017-23, 1977.

LISTE, F.; GASCÓN, M.; PALACIO, J. Metabolismo del hierro en el perro: aplicaciones diagnósticas de la determinación del estatus férrico y valores de referencia en la raza Beagle. **Annals of Veterinary**. Murcia v. 9-10, p. 75-81, 1994.

MONTEIRO, S.C.M.; MOREIRA, W.H.; SOUZA, A.P. Metabolismo do Ferro. **Ciência e Cultura**, Barretos, v.1, n.1, p. 11-18, 2006.

MORGAN, E.H. The role of transferrin in iron metabolism. **Medical Journal of Australia**. v.2, p. 322-5, 1972.



NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 323-342, 2006.

NEUMANN, S. Serum Iron Level as an Indicator for Inflammation in Dogs and Cats **Compendium of Clinic Pathology**, v.12, p. 90–94, 2003.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.223-239.

SMITH, R.J.; SPEZIALE, S.C.; BOWMAN, B.J. Properties of interleukin-1 as a complete secretagogue for human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 130, p. 1233-1240, 1985.

SIMPSON, K.W., MEYER, D.J., BOSWOOD, A., WHITE, R.N., MASKELL, I.E. Iron status and erythrocyte volume in dogs with congenital portosystemic vascular anomalies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.11, p.14–19, 1997.

STEINBERG, J.D.; OLVER, C.S. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 34, n.1, p.23-27, 2005.

STONE, M.S. FREDEN, G.O. Differentiation of anemia of inflammatory disease from anemia of iron deficiency. **Compendium of Continue Education for Practitioner Veterinarian**. v.12, p.963-966, 1990.

SOUBASIS, N.; RALLIS, T.S.; VLEMMAS, J. et al. Serum and liver iron concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.21, p. 599-604, 2006.

TARALOV, Z.; KOUMTCHEV, E.; LYUTAKOVA, Z. Erythrocyte ferritin levels in chronic renal failure patients. **Folia Med**, v.20, n.4, p. 65-70, 1998.

TYLER, R.D.; COWEL, R.L. Classification and diagnosis of anemia. **Comparative Haematology International**. v. 6, p. 1-16, 1996.

TVEDTEN, H; WEISS, D.J. Classification and Laboratory Evaluation of Anemia. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 143-150.

VERNET M. Immunochemical assay of transferrin and iron saturation in serum. **Clinical Chemistry**, v.39, p. 2352–3, 1993.

WANER, T., HARRUS, S. Anemia of Inflammatory Disease. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 205-209.

WATANABE, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO S. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. **BioMetals**, Holanda, v.13, p.57-63, 2000.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; PHILLIPS, R.M. Enzyme linked immunosorbent assay for canine serum ferritin using monoclonal anti-canine ferritin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p.1193-1195, 1988

WEISER, M.G.; KOCIBA, G.J. Sequential change in erythrocytes volume distribution and microcytosis associated with iron deficiency in kittens. **Veterinary Pathology**. v. 20, p.1-12, 1983.

WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. Erythrocyte Disorders. In: \_\_\_\_\_. **Small Animal Clinical Diagnosis** – by Laboratory Methods. 4ed. Estados Unidos: Sauders, 2004, p. 38-62.

YAMANISHI, H.; IYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.et al. Total Iron-binding Capacity Calculated from Serum Transferrin Concentration or Serum Iron Concentration and Unsaturated Iron-binding Capacity. **Clinical Chemistry** , v. 49, n. 1, p. 175-178, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços tecnológicos na clínica veterinária têm crescido rapidamente a nível mundial e também na realidade brasileira, sendo cada vez mais freqüente a utilização de exames laboratoriais no auxílio ao diagnóstico das enfermidades.

A clínica médica dos animais de companhia convive rotineiramente com inúmeras enfermidades que desencadeiam variados graus de anemia nos pacientes. Além disto, existem animais que não apresentam sinais clínicos e hematológicos de anemia, mas que estão com deficiência de ferro, podendo desenvolver anemia com o agravamento desta deficiência. A determinação dos parâmetros do ferro existe para auxiliar na prevenção da anemia, na identificação das suas prováveis causas e no acompanhamento de tratamentos de pacientes.

Infelizmente, a dinâmica do ferro não é amplamente difundida no meio veterinário, sendo necessário expandir as informações sobre esta importante ferramenta entre os clínicos. É necessário ressaltar que os parâmetros devem ser avaliados em conjunto, para a correta interpretação dos resultados.

O presente estudo foi importante para apresentar os valores do ferro na população canina de Curitiba, uma vez que existem poucas informações sobre estes dados no Brasil.

A análise da ferritina agrega muitas informações importantes quanto ao estado do ferro no organismo, mas infelizmente ainda está indisponível para a rotina clínica veterinária no Brasil.

Novos parâmetros para o acompanhamento do metabolismo do ferro, como os receptores da transferrina, a dosagem da hepcidina foram desenvolvidos para seres humanos e começa a ser investigados em animais,

Diante da importância deste tema, sugere-se que sejam realizados trabalhos futuros de monitoramento de pacientes anêmicos, de diversas causas, com a determinação dos parâmetros disponíveis do ferro.

Outra perspectiva de pesquisa é a purificação da ferritina e desenvolvimento de anticorpo espécie-específico, devido à inexistência de materiais específicos para a análise de ferritina canina no Brasil.

## APÊNDICES

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA Nr:      M      m     MACHO / IDADE             

DATA COLETA:

NOME:		PROCEDÊNCIA:	
RAÇA:		PESO:	
NASCIMENTO:		PELAGEM:	
VACINAÇÃO: AR V8 V10		VERMIFUGO: S N	
Outra: <u>                    </u>			
ALIMENTAÇÃO: <u>                                    </u>			
HISTÓRICO CLÍNICO:			
DOENÇAS/ MEDICAÇÕES:			
EXAME FÍSICO: TEMPERATURA: <u>            </u>			
1. Condição Corpórea: ( ) Normal ( ) Magro ( ) Obeso		2. Mucosas: ( ) rósea ( ) pálida ( ) cianótica ( ) ictérica	
3. Hidratação: ( ) Normal ( ) Leve Desidratação ( ) Moderada desidratação ( ) Severa Desidratação		4. Cabeça: Olhos: ( ) N ( ) A <u>            </u> Ap. Auditivo: ( ) N ( ) A <u>            </u> Boca: ( ) N ( ) A <u>            </u>	
5. Linfonodos: Submandibular ( ) N ( ) A Pré-escapulares ( ) N ( ) A Poplíteos ( ) N ( ) A		6. Tec. Cutâneo: Pêlo: ( ) N ( ) A <u>            </u> Pele: ( ) N ( ) A <u>            </u> Parasitas ( ) A ( ) P <u>            </u>	
7. Ap. Resp: ( ) N ( ) A <u>            </u> FR: <u>            </u> mov/min		8. Ap. Circ: ( ) N ( ) A <u>            </u> FC: <u>            </u> batim./min TPC ( ) N ( ) A <u>            </u>	
9. A Locomotor: Membros ( ) N ( ) A <u>            </u>		10. Ap. Digestivo: Fezes ( ) N ( ) A <u>            </u> Palpação Abd. ( ) N ( ) A <u>            </u>	
11. Ap. Genitourinário: Bexiga e rins: ( ) N ( ) A <u>            </u> Urina ( ) N ( ) A <u>            </u> Pênis ( ) N ( ) A <u>            </u> Testículos ( ) N ( ) A <u>            </u>		12. Sist. Nervoso: Marcha: ( ) N ( ) A <u>            </u>	
13. Atividade Física: ( ) Ativo ( ) Apático		14. Outros:	

## FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA Nr: \_\_\_\_\_ F f

FÊMEA / IDADE \_\_\_\_\_

## DATA COLETA:

NOME:	PROCEDÊNCIA:
RAÇA:	PESO:
NASCIMENTO:	PELAGEM:
VACINAÇÃO: AR V8 V10 Outra: _____	VERMIFUGO: S N
CIO: S data: _____ N data: _____	Gestação: S N Amamentação: S N
ALIMENTAÇÃO:	
HISTÓRICO CLÍNICO:	
DOENÇAS/ MEDICAÇÕES:	
EXAME FÍSICO: TEMPERATURA: _____	
1. Condição Corpórea: ( ) Normal ( ) Magro ( ) Obeso	2. Mucosas: ( ) rósea ( ) pálida ( ) cianótica ( ) ictérica
3. Hidratação: ( ) Normal ( ) Leve Desidratação ( ) Moderada desidratação ( ) Severa Desidratação	4. Cabeça: Olhos: ( ) N ( ) A _____ Ap. Auditivo: ( ) N ( ) A _____ Boca: ( ) N ( ) A _____
5. Linfonodos: Submandibular ( ) N ( ) A Pré-escapulares ( ) N ( ) A Poplíteos ( ) N ( ) A	6. Tec. Cutâneo: Pêlo: ( ) N ( ) A _____ Pele: ( ) N ( ) A _____ Parasitas ( ) A ( ) P _____
7. Ap. Resp: ( ) N ( ) A _____ FR: _____ mov/min	8. Ap. Circ: ( ) N ( ) A _____ FC: _____ batim./min TPC: ( ) N ( ) A _____
9. A Locomotor: Membros ( ) N ( ) A _____	10. Ap. Digestivo: Fezes ( ) N ( ) A _____ Palpação Abd. ( ) N ( ) A _____
11. Ap. Genitourinário: Bexiga e rins: ( ) N ( ) A _____ Urina ( ) N ( ) A _____ Vulva (secreções) ( ) N ( ) A _____ Gl. Mamária ( ) N ( ) A _____	12. Sist. Nervoso: Marcha: ( ) N ( ) A _____
13. Atividade Física: ( ) Ativo ( ) Apático	14. Outros:

## ANEXO



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

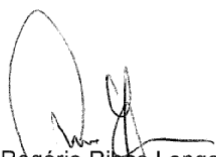
### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 029/2008, referente ao projeto "Caracterização de parâmetros laboratoriais relacionados ao metabolismo do ferro em cães saudáveis e anêmicos", sob a responsabilidade de Luciana Salini Abrahão Pires, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 22 de setembro de 2008. Este certificado expira em 22 de setembro de 2009.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 029/2008, regarding the project "Caracterização de parâmetros laboratoriais relacionados ao metabolismo do ferro em cães saudáveis e anêmicos", in charge of Luciana Salini Abrahão Pires, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on September 22, 2008. This certificate expires on September, 2009.

Curitiba, 22 de setembro de 2008



Rogério Ribas Lange  
Presidente



Fabiano Montiani Ferreira  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.